



**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI GENOVA**  
**Facoltà di Medicina e Chirurgia**  
**Dottorato di ricerca in Scienze Pediatriche (XXIX ciclo)**  
**indirizzo Malattie Muscolari, Neurodegenerative e**  
**Metaboliche dell'età evolutiva**

---

**TESI DI DOTTORATO**

**“RICERCA DI NUOVI TARGET TERAPEUTICI NELLA DISTROFIA  
MUSCOLARE DA DEFICIT DI DISTROFINA E ALFA-  
SARCOGLICANO”**

**Coordinatore: Chiar.mo Prof. Carlo Minetti**

**Tutor: Dott. Federico Zara**

**Dottoranda: dott.ssa Stefania Assereto**

Anno Accademico 2017-2018

<b>INDICE</b>	<b>Pag</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>3</b>
<b>1. INTRODUZIONE</b>	<b>4</b>
<b>2. SCOPO DELLA RICERCA</b>	<b>13</b>
<b>3. MATERIALI E METODI</b>	<b>14</b>
<b>4. RISULTATI</b>	<b>22</b>
<b>5. DISCUSSIONE</b>	<b>52</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>53</b>

## **ABSTRACT**

Con il termine di distrofie muscolari si indica un gruppo di gravi malattie neuromuscolari, ad esordio prevalentemente nell'età pediatrica, geneticamente determinate a carattere degenerativo che causano progressiva atrofia della muscolatura scheletrica. Il numero dei soggetti affetti da questi disordini costituisce circa il 10% di tutti i malati neurologici.

Tali patologie, tra le quali la Distrofia Muscolare di Duchenne (DMD) rappresenta la forma più frequente, sono dovute a mutazioni in geni che codificano proteine associate alla membrana plasmatica della cellula muscolare e la cui perdita comporta una membrana muscolare più fragile e suscettibile al danno indotto dalla contrazione.

Nonostante il grande sforzo per identificare una terapia per queste patologie, una cura specifica non è al momento disponibile. Per tale motivo, nuovi approcci terapeutici connessi con la complessa patologia dei difetti di membrana, sono oggetto di ricerca.

### Razionale

Nelle distrofie muscolari da difetto delle proteine di membrana, l'instabilità del sarcolemma si traduce in una serie di processi secondari degenerativi quali l'infiltrazione di cellule infiammatorie e la ridotta rigenerazione. In questo scenario, l'ATP extracellulare (eATP) rilasciato dalle miofibre in necrosi induce un'attivazione protratta dei recettori P2X(1-7) determinando un effetto diretto legato ad alterazione dell'omeostasi del calcio intracellulare e un effetto indiretto tramite il 'triggering' della fase iniziale della risposta immunitaria e l'inibizione delle cellule T regolatorie (Treg) ad azione immunosoppressoria. Lo scopo del lavoro è quindi quello di valutare gli effetti dell'inibizione dei recettori purinergici in modelli murini di distrofie da difetto di proteine di membrana.

## 1. INTRODUZIONE

### **Le Distrofie Muscolari**

Il termine “distrofia muscolare” (DM) identifica un gruppo di malattie muscolari progressive, eterogeneo dal punto di vista clinico, genetico e molecolare. Clinicamente, queste malattie si presentano con debolezza muscolare a qualsiasi età, dalla nascita alla mezza età, spesso con valori elevati di creatina chinasi sierica (CK) e mostrano una significativa morbidità e disabilità. A livello di patologia muscolare, le distrofie muscolari sono caratterizzate da fibre necrotiche e rigeneranti, aumento della variabilità del calibro fibrale, fenomeni di splitting fibrale e nuclei centralizzati.

Cicli di degenerazione e rigenerazione successivi delle fibre muscolari avvengono fino all'esaurirsi del potenziale rigenerativo del muscolo, infine si traducono in necrosi e nella conseguente sostituzione del muscolo con tessuto adiposo e fibroso.

Classicamente, le distrofie muscolari sono state suddivise sulla base di criteri clinici, in particolare in base al coinvolgimento muscolare, all'età di insorgenza e alla modalità di trasmissione.

La Distrofia Muscolare di Duchenne (DMD) è la più severa e comune forma di distrofia muscolare (1 su 3,500 maschi nati vivi), trasmessa con meccanismo X-linked [1]. L'esordio di questa patologia avviene dall'osservazione delle difficoltà motorie vissute dai bambini tra i 2 e i 5 anni di età. La degenerazione del muscolo scheletrico è progressiva, con conseguente perdita di deambulazione intorno all'età di 13 anni. I pazienti DMD hanno un'aspettativa di vita di circa 30 anni e il decesso avviene generalmente a causa di complicanze respiratorie o cardiache [1].

La DMD è causata da mutazioni nel gene DMD. L'RNA messaggero della distrofina è espresso nel muscolo scheletrico, cardiaco e liscio, così come nel cervello [2]. La proteina distrofina, codificata dal gene DMD è localizzata nella membrana plasmatica muscolare (sarcolemma) e forma un complesso distrofina-glicoproteine (DGC) con i complessi del distroglicano, del sarcoglicano e con quello sintrofina/distrobrevina.

Il DGC permette il legame tra l'actina citoscheletrica e la lamina basale delle fibre muscolari [3] agendo da stabilizzante di membrana durante la contrazione muscolare o come un trasduttore di segnali dalla matrice extracellulare al citoplasma muscolare.

Le mutazioni nel gene DMD comprendono prevalentemente delezioni o duplicazioni ma esistono anche mutazioni missenso, nonsense ed inserzioni. Quando una mutazione del gene DMD distrugge il codice di lettura degli amminoacidi (una mutazione cosiddetta out-of-frame), il difetto di distrofina risulta in un fenotipo severo di DMD. D'altro canto, una mutazione che mantiene inalterato il codice di lettura (mutazione in-frame) tende a produrre una distrofina tronca ma funzionante, che porta ad un fenotipo più lieve noto come Distrofia Muscolare di Becker (DMB).

Le distrofie muscolari dei cingoli (o Limb Girdle Muscular Dystrophies - LGMDs) rappresentano un gruppo eterogeneo di patologie caratterizzate da debolezza muscolare in particolare a livello dei muscoli del cingolo pelvico e del cingolo scapolare. La patologia esordisce generalmente nella seconda o terza decade con difficoltà ad alzare le braccia, sollevare pesi, fare le scale, alzarsi da terra e correre.

Esistono due forme principali di distrofie muscolari dei cingoli:

- le forme dominanti (LGMD1A-LGMD1H): sono di solito le più benigne e relativamente rare, e rappresentano meno del 10% di tutte le distrofie dei cingoli;
- le forme recessive (LGMD2A-LGMD2W): sono molto più frequenti e presentano una prevalenza globale di una persona affetta su 15.000, con una diversa distribuzione geografica.

Mentre tutte le proteine codificate dai geni responsabili delle forme recessive sono state identificate, delle proteine responsabili delle forme dominanti se ne conoscono solo tre. La più recente classificazione utilizza la proteina carente per individuare la specifica formula di Distrofia muscolare dei cingoli: si parlerà quindi di calpainopatia per le malattie da deficit di calpain-3 (proteasi presente nel muscolo), di disferlinopatia per le malattie da deficit di disferlina, ecc.

All'interno dello spettro delle LGMDs, vi è una grande variabilità nell'età d'insorgenza, gravità e presentazione clinica. La diversità a livello clinico rispecchia l'immagine molecolare, con le mutazioni causative in molti geni diversi che codificano per svariati componenti delle miofibre: dell'apparato contrattile, della lamina nucleare, del sarcolemma o citoplasmatiche (Tabella 1 e 2).

<b>Patologia</b>	<b>Locus</b>	<b>Gene</b>	<b>Proteina</b>	<b>Insorgenza</b>	<b>Progressione</b>
LGMD1A	5q31.2	TTID	Myotilin	Adulta	Lenta
LGMD1B	1q22	LMNA	Lamin A/C	Variabile	Lenta
LGMD1C	3p25.3	CAV3	Caveolin-3	infanzia	Lenta/moderata
LGMD1D	7q36	DNAJB6	DnaJ/Hsp40	Variabile	Lenta
LGMD1E	2q35	DES	Desmin	Adulta	Lenta
LGMD1F	7q32	TNPO3	Transportin3		Lenta/moderata
LGMD1G	4q21	HNRPDL	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteinD-like protein	Variabile	Lenta
LGMD1H	3p23-p25	-	-	Variabile	Lenta

Tabella 1. Distrofie muscolari dei cingoli – Forme autosomiche dominanti

<b>Patologia</b>	<b>Locus</b>	<b>Gene</b>	<b>Proteina</b>	<b>Insorgenza</b>	<b>Progressione</b>
LGMD2A	15q15	CAPN3	Calpain 3	Adolescenza	Moderata/ rapida
LGMD2B	2p13.2	DYSF	Dysferlin	Giovane adulto	Lenta
LGMD2C	13q12	SGCG	g-Sarcoglycan	Infanzia	Veloce
LGMD2D	17q21.33	SGCA	a-Sarcoglycan	Infanzia	Veloce
LGMD2E	4q12	SGCB	b-Sarcoglycan	Infanzia	Veloce
LGMD2F	5q33	SGCD	d-Sarcoglycan	Infanzia	Veloce
LGMD2G	17q12	TCAP	Telethonin	Adolescenza	Lenta
LGMD2H	9q33.1	TRIM32	Tripartite motif containing 32	Adulto	Lenta
LGMD2I	19q13.3	FKRP	Fukutin Related protein	Tarda infanzia	Moderata
LGMD2J	2q24.3	TTN	Titin	Giovane adulto	Grave
LGMD2K	9q34.1	POMT1	Protein-O-	Infanzia	Lenta

			mannosyl transferase 1		
LGMD2L	11p13-p12	ANO5	Anoctamin 5	Variabile	Lenta
LGMD2M	9q31	FKTN	Fukutin	Infanzia	Moderata
LGMD2N	14q24	POMT2	Protein-O-mannosyl transferase 2	Infanzia	Lenta
LGMD2O	1p34.1	POMGn T1	Protein o-linked mannose beta 1,2-N-acetylglucosaminyl transferase	Tarda infanzia	Moderata
LGMD2P	3p21	DAG1	Dystroglycan	Infanzia	Moderata
LGMD2Q	8q24	PLEC1	Plectin	Infanzia	Lenta
LGMD2R	2q35	DES	desmin	Giovane adulto	
LGMD2S	4q35	TRAPPC 11	Transport protein particle complex 11	Giovane adulto	Lenta
LGMD2T	3p21	GMPPB	GDP-mannose pyrophosphorylase B	Infanzia	
LGMD2U	7p21	ISPD	Isoprenoid synthase domain containing	Precoce/tardiva	Rapida/moderata
LGMD2V	17q25.3	GAA	Alpha-1,4-glucosidase	Variabile	Variabile
LGMD2W	2q14	LIMS2	Lim and senescent cell antigen-like domains 2	Infanzia	

Tabella 2. Distrofie muscolari dei cingoli – Forme autosomiche recessive

Molte di queste proteine sono esse stesse coinvolte in altri tipi di malattia muscolare, e in questo senso LGMD può essere considerata come parte di un continuum di patologia che va da forme di distrofie muscolari congenite severe con esordio neonatale a miopatie relativamente benigne ad esordio più tardivo.

Mentre la perdita del legame tra il citoscheletro e la matrice extracellulare è in grado di spiegare molto della patologia nella Duchenne e nelle distrofie muscolari congenite [3,4], in molte LGMDs il meccanismo fisiopatologico che sta alla base della patologia non è ancora noto.

Lo studio della patologia molecolare di queste malattie quindi, non solo rappresenta il potenziale per chiarire i meccanismi patogenetici, ma può anche individuare nuovi bersagli per l'intervento terapeutico.

I sarcoglicani sono glicoproteine transmembrana che formano un distinto sottocomplesso del DGC. Difetti dei sarcoglicani alfa, beta, gamma e delta sono conosciuti come sarcoglicanopatie o LGMD2C-F e possono essere gravi, simili alla Duchenne ad esordio nella prima infanzia ma possono anche presentarsi con una forma clinica più lieve. Il coinvolgimento cardiaco e respiratorio sono comuni, con una porzione sostanziale di pazienti che sviluppano cardiomiopatia [5].

Il deficit di ciascun elemento del complesso dei sarcoglicani tipicamente si traduce nella perdita di altri membri del sarcolemma, benché sia stata riportata la perdita isolata del singolo sarcoglicano [6-8].

La LGMD di tipo 2D (LGMD2D) è causata da mutazioni nel gene adalina, che mappa sul cromosoma 17q21 e codifica per l'alfa-sarcoglicano. La gravità del fenotipo è correlata con l'entità del deficit di alfa-sarcoglicano nel muscolo. Questa sarcoglicanopatia è caratterizzata da scapole alate e ipertrofia del polpaccio. L'attività della creatina chinasi (CK) nel siero è sempre elevata.

## **Terapie**

Allo stato attuale non ci sono trattamenti disponibili per questi pazienti.

Accanto alle terapie sintomatiche, sono stati sviluppati vari approcci mirati al difetto molecolare quali terapia genica con l'impiego di vettori virali, terapia con exon-skipping, trapianto di cellule staminali, terapia cosiddetta "read-through" e agenti farmacologici, ma nessuno di questi ha incontrato al momento un positivo riscontro nella pratica clinica.



La terapia genica è stata effettuata in tutti i modelli animali di sarcoglicanopatie, supportata dalle dimensioni ridotte del cDNA rispetto a quello per la distrofina. I migliori risultati sono stati ottenuti con i virus non patogeni adeno-associati [9]. Questa strategia è invece limitata per la DMD a causa delle notevoli dimensioni del gene esogeno inserito, sebbene alcuni gruppi abbiano sviluppato una microdistrofina, più corta ma funzionante, che è “targettata” dal promotore muscolo specifico per la creatina chinasi (CK) in combinazione con vettori AAV di vari sierotipi. Tuttavia, la terapia genica presenta alcuni svantaggi: primo fra tutti il bersaglio, essendo il muscolo uno dei tessuti più estesi del corpo i livelli di espressione della proteina corretta si sono dimostrati insufficienti a ripristinare il difetto nei vari distretti anatomici; altro svantaggio si è rivelato essere la risposta immune e infiammatoria nei confronti degli AAV e/o della proteina distrofina corretta [10].

L'uso di specifici oligonucleotidi antisenso (AOs) per indurre exon-skipping e generare trascritti in-frame, tradotti in proteine funzionali, seppur di dimensioni ridotte rispetto al normale, rappresenta un ulteriore approccio per la terapia di malattie causate da mutazioni che generano codoni di stop prematuri. Questo approccio è utile per le grandi proteine che possiedono molte unità funzionali ripetute (per esempio gli “spectrin-like repeats” della distrofina), alcune delle quali possono essere eliminate senza conseguenze funzionali drammatiche [10,11]. Quest'opzione non è applicabile alle sarcoglicanopatie poiché non ci sono domini superflui nella porzione extracellulare dei sarcoglicani e la loro struttura genomica impedisce qualsiasi exon-skipping significativa. L'infusione di cellule geneticamente modificate o da donatore sano rappresenta un altro approccio per il trattamento del muscolo distrofico. Diverse popolazioni di cellule staminali mostrano potenziale miogeno e sono state utilizzate per la loro capacità di correggere il fenotipo distrofico. Queste includono le cellule muscolari derivate da cellule satellite, le cellule staminali mesenchimali derivate dal midollo osseo, e le cellule derivate da pareti dei vasi sanguigni, come mesangioblasti o periciti [12,13]. Benchè una popolazione di cellule staminali pluripotenti derivata da midollo osseo non sia stata in grado di recuperare il delta-sarcoglicano [14], cellule satelliti muscolari hanno raccolto maggiori successi [15].

Mesangioblasti iniettati nei muscoli di topi con deficit di alfa-sarcoglicano e cani con deficit di distrofina hanno mostrato un buon potenziale di riuscita [16,17]. Oltre alla difficoltà di trattare il tessuto più abbondante del corpo, la terapia con cellule staminali presenta diversi svantaggi potenziali, quali la necessità di immunosoppressione,

difficoltà nell'individuazione delle cellule staminali adulte idonee, e possibile diffusione ed efficienza di colonizzazione.

Le strategie farmacologiche stanno diventando un'importante alternativa o una strategia complementare alla terapia genica, poiché i farmaci possono più facilmente essere indirizzati all'organo o tessuto bersaglio. In generale, le terapie farmacologiche possono essere finalizzate a correggere il difetto primario o a trattarne le conseguenze patologiche.

Il primo trattamento impiegato per produrre effetti benefici è stato l'utilizzo di corticosteroidi nei pazienti DMD; tuttavia, oltre all'effetto anti-infiammatorio, i meccanismi di azione rimangono non noti. Un altro approccio farmacologico che ha ottenuto un buon successo è quello che permette di superare i codoni di stop prematuri (mutati) a livello di mRNA, favorendo così la produzione della proteina [10,18]. Il PTC124, un agente non aminoglicoside molto promettente, ha dimostrato di indurre selettivamente la lettura ribosomiale attraverso i codoni di stop prematuri, ma non attraverso il normale codone di stop [19,20]. Dal 2014 tale farmaco è disponibile per il trattamento dei pazienti DMD con mutazioni nonsense, con il nome commerciale di Translarna.

### **Distrofie Muscolari e Infiammazione**

Nella distrofia muscolare di Duchenne, la fragilità della fibra muscolare e l'instabilità del sarcolemma sono alcuni dei risultati della mutazione della proteina. Questi meccanismi molecolari innescano e perpetuano la reazione immune, che è una caratteristica importante della fisiopatologia di questo disordine. Se il muscolo fragile subisce un processo di stiramento, il sarcolemma subisce uno stress meccanico. Di conseguenza incrementa la permeabilità al  $\text{Ca}^{2+}$  e varie proteasi  $\text{Ca}^{2+}$  dipendenti, quali le calpaine vengono attivate determinando necrosi [21]. Successivamente, le miofibre necrotiche vengono attaccate e rimosse da macrofagi principalmente M1. Allo stesso tempo, le cellule M1 producono citochine proinfiammatorie e reclutano ulteriori cellule infiammatorie, incrementando il processo infiammatorio (la cosiddetta infiammazione di tipo 1). E' stato riportato che la biopsia del muscolo distrofico mostra una sovra-espressione di citochine pro-infiammatorie quali *tumor necrosis factor alpha* (TNF- $\alpha$ ), interleuchina-1 (IL-1), e interleuchina-6 (IL-6) rispetto a muscoli sani, con conseguente infiammazione cronica [22–25]. E' stato dimostrato inoltre che i pazienti DMD hanno

un incremento nei livelli sierici di citochine TNF- $\alpha$ , IL-6 rispetto ai soggetti sani [22,23,26].

Al contrario, i meccanismi molecolari che avviano e perpetuano la reazione immunitaria in LGMD2D non sono ancora state identificate.

L'insorgenza di una risposta infiammatoria in assenza di agenti infettivi è dovuto alle cosiddette "*damage-associated molecular pattern molecules*" (DAMPs) [27].

Queste molecole self svolgono precisi ruoli intracellulari, ma quando vengono rilasciati nello spazio extracellulare esercitano diverse funzioni. Nel muscolo, l'ATP è noto soprattutto per la sua funzione quale fonte energetica, ma, come DAMP è un precursore ideale di danno tissutale: è disponibile in alte concentrazioni all'interno del citoplasma di ogni cellula ed è rapidamente rilasciato in seguito a danno cellulare. L'ATP extracellulare (eATP) attiva i canali ionici purinergici non selettivi di membrana: recettori P2X 1-7 e recettori accoppiati alla proteina guanina nucleotide P2Y1, 2, 4, 6, 11-14 [28,29]. L'effetto finale di eATP su una data cella dipende dalla composizione dei recettori P2 sulla sua superficie. In immunità, il segnale purinergico è attivo nelle cellule presentanti l'antigene (APC), macrofagi e monociti. eATP, rilasciato dal citoplasma delle cellule morenti, contribuisce al richiamo di APC e nei macrofagi è necessario per la secrezione IL1b [30].

Tuttavia, eATP determina anche attivazione delle cellule T effettrici, così come l'inibizione della funzione e della stabilità delle cellule T regolatorie (Treg) [31,32]. Il blocco della cascata dell'eATP (utilizzando antagonisti dei recettori P2X) incrementa le Treg e migliora l'esito dell'infiammazione mediata da cellule T in modelli di autoimmunità [32-35].

Le Tregs, in particolare quelle Foxp3+, sono fondamentali per la tolleranza degli auto-antigeni [36,37]. Un incremento delle cellule Tregs migliora la progressione di malattie infiammatorie [38-41] e la sicurezza e la fattibilità del trasferimento di Tregs è in fase di sperimentazione in studi clinici di infiammazione e rigetto di trapianto. Nel muscolo, le Tregs svolgono un ruolo protettivo mediando l'infiammazione di tipo II: le Tregs si accumulano nei siti di necrosi ed esprimono IL10, una citochina in grado di ridurre la patologia muscolare nei topi distrofinopatici [42,43]. Inoltre, le Tregs esercitano un effetto diretto stimolante sui precursori miogenici (MPCs), noti come cellule satellite, esprimendo Anfiregulina (Areg), un fattore che agisce direttamente sulla rigenerazione in cellule satellite e mioblasti [44].

Le cellule muscolari esprimono i recettori P2X e altri componenti chiave della via dell'inflammasoma suggerendo che le miofibre possano esercitare un ruolo diretto nello sviluppo e nel mantenimento della risposta infiammatoria [45]. La sovra espressione di P2X7R è stata dimostrata nel muscolo scheletrico del topo *mdx* e in mioblasti primari umani DMD e l'esposizione a eATP in queste linee cellulari innesca un incremento forte e sostenuto dei livelli di  $\text{Ca}^{2+}$  intracitoplasmatico [46-48].

Il ruolo di eATP potrebbe essere ancora più rilevante nel deficit a-SG, poiché a-SG presenta un sito di legame per ATP nel suo dominio extracellulare ed è caratterizzato da una attività ecto-ATPasica [49-50]. È possibile che a-SG possa attenuare l'ampiezza e/o la durata dei segnali indotti da eATP e quindi modulare l'attività dei recettori P2X nelle cellule muscolari. Nel nostro progetto, noi ipotizziamo un modello nel quale eATP rilasciato da miofibre in degenerazione eserciti un duplice ruolo nella patogenesi delle distrofie muscolari: attraverso l'attivazione dell'immunità innata e adattativa e l'inibizione del reclutamento di cellule Treg e, un'azione diretta sulla cellula muscolare, mediante attivazione dell'inflammasoma ed alterazione dell'omeostasi del  $\text{Ca}^{2+}$ .

## 2. SCOPO DELLA RICERCA

Nelle distrofie muscolari da difetto delle proteine di membrana, l'instabilità del sarcolemma si traduce in una serie di processi secondari degenerativi quali l'infiltrazione di cellule infiammatorie e ridotta rigenerazione. In questo scenario, l'ATP extracellulare (eATP) rilasciato dalle miofibre in necrosi induce un'attivazione protratta dei recettori P2X (1-7) determinando un effetto diretto legato ad alterazione dell'omeostasi del calcio intracellulare e un effetto indiretto tramite il 'triggering' della fase iniziale della risposta immunitaria e l'inibizione delle cellule T regolatorie (Treg) ad azione immunosoppressoria.

In accordo con questa ipotesi, abbiamo voluto trattare:

- topi *mdx*, un modello murino spontaneo di distrofia muscolare di Duchenne, e
- topi alfa-sarcoglicano knock-out (*Sgca*) un modello animale di distrofia muscolare dei cingoli di tipo 2D,

con un antagonista dei recettori purinergici (oxidase-ATP [oATP]) per valutare l'effetto dell'inibizione della via di segnale eATP/P2X, sul fenotipo distrofico, sul potenziale rigenerativo delle cellule satelliti, e sull'infiltrato infiammatorio muscolare mediante analisi di parametri clinici, istopatologici ed immunologici.

### 3. MATERIALI E METODI

#### Biopsie muscolari

Tutti i campioni umani sono stati ottenuti dopo che i pazienti avevano firmato moduli di consenso informato in conformità con le linee guida del Comitato etico dell'Istituto Giannina Gaslini, tra i quali i protocolli sperimentali per biopsie muscolari.

L'RNA totale è stato isolato dalle biopsie muscolari ottenute per scopi diagnostici da sette pazienti affetti da Distrofia muscolare DMD confermata geneticamente e tre affetti da distrofia muscolare di Becker. Le sezioni di muscolo congelato sono state colorate con ematossilina ed eosina (EE) ed è stata valutata la presenza di fibrosi, degenerazione e rigenerazione, ed infiammazione, secondo criteri arbitrari, per due patologi indipendenti.

#### Trattamento in vivo con oATP

Topi B6Ros.cG-D<sup>mdmdx-4Cv/J</sup> (*mdx*, maschi, di 4 settimane; Charles River Laboratories) e topi wildtype (Wt) C57Bl/6J di 4 settimane di vita sono stati trattati con 100 mL di oATP a 6 mmol/L o soluzione salina tamponata con fosfato (PBS) ogni giorno per 2 o 4 settimane da i.p. iniezione e sono stati sacrificati mediante inalazione di anidride carbonica (n = da 4 a 8 topi per ogni gruppo sperimentale). Un gruppo di topi Wt C57Bl/6J maschi della stessa età è stato usato come controllo interno (n = 5). I topi *mdx* sono stati assegnati in modo casuale ai diversi gruppi sperimentali. I campioni di sangue sono stati raccolti mediante puntura periorbitaria alla fine della seconda e della quarta settimana di trattamento, sono stati centrifugati per 10 minuti a 7000xg ed il siero è stato isolato e conservato a -20 ° C. Le concentrazioni di creatina chinasi (CK) sono state misurate con il sistema quantitativo CK-NAC secondo le istruzioni della ditta produttrice (BPC BioSED). Tutti gli esperimenti sugli animali sono stati eseguiti in conformità con le linee guida dell'Ufficio federale di veterinaria federale e autorizzati dal comitato per gli studi sugli animali.

#### Corsa forzata su tapis roulant

I topi sono stati sottoposti all'esecuzione di esercizio fisico con tapis roulant cronico mediante l'utilizzo di un sistema di tapis roulant Exer 3/6 (Columbus, OH) secondo le procedure operative standard (SOP). In breve, i topi *mdx* trattati con oATP, i topi *mdx* trattati con PBS e i topi Wt di controllo erano acclimatati al tapis roulant per 3 giorni

dopodichè sottoposti all'esecuzione della corsa due volte a settimana per un totale di 4 settimane. Ogni sessione di esercizio di corsa al tapis roulant orizzontale ha la durata 40 minuti: 10 minuti di riscaldamento alla velocità di 8 miglia al minuto, seguito da 30 minuti di corsa ad una velocità di 12 miglia al minuto (più il tempo supplementare delle soste). Alla fine della seconda e della quarta settimana di trattamento, è stato misurato il numero di fermate per ogni gruppo sperimentale.

### **Test di sospensione sui quattro arti (Four Limb Hanging Test)**

Alla conclusione della seconda e della quarta settimana di trattamento, la forza muscolare dei topi *mdx* trattati con oATP, dei topi *mdx* trattati con PBS e dei topi WT di controllo è stata valutata con il test di sospensione sui quattro arti che valuta il tempo massimo di sospensione del topo ad una griglia. Il test è stato eseguito secondo la procedura standardizzata descritta nella SOP-ID: DMD\_M.2.1.004 [51]. Il test “Four Limb Hanging” o Test di sospensione con quattro arti utilizza un sistema di griglia metallica per misurare in modo non invasivo la capacità dei topi di mantenere una tensione durevole della muscolatura dei quattro arti in grado di opporsi alla loro forza gravitazionale. Il test viene generalmente impiegato nei modelli murini di malattie neuromuscolari per valutare la debolezza muscolare e la coordinazione motoria, per determinare il corso naturale di una malattia neuromuscolare o per valutare l'efficacia di approcci di trattamento genetico o farmacologico poiché rappresenta una misura efficace e riproducibile per la valutazione degli effetti di potenziali composti terapeutici. In breve, il test prevede che l'animale venga sospeso su una griglia posta ad un'altezza di circa 35 centimetri dal piano di lavoro. Sotto la griglia deve essere posto un supporto morbido allo scopo di attutire la caduta dell'animale. Il test valuta il tempo massimo di sospensione del topo durante un periodo di 3 minuti. Ogni topo parte da uno score di 10 punti che vengono ridotti di una unità ogni qualvolta il topo cada dalla griglia. In caso di caduta il tempo viene fermato, il topo viene riposizionato sulla griglia dall'esaminatore, ed il tempo viene fatto ripartire.

### **Colorazione vitale con Evans Blue Dye**

Per rilevare le fibre muscolari danneggiate, 20 ore prima del sacrificio è stato iniettato nella cavità peritoneale di ogni topo il colorante Evans Blue (EBD, 0,1 ml / 10 g di peso corporeo). Dopo il sacrificio, i muscoli gastrocnemi (GN) sono stati raccolti e congelati rapidamente in isopentano raffreddato con azoto liquido, e conservati in azoto liquido

per le successive analisi. Le sezioni congelate, ottenute tagliando il muscolo con un criostato, sono stati osservati con un Axioplan M2 Microscopio per imaging (Zeiss) per rilevare il segnale rosso di autofluorescenza dell'EBD. Le fibre positive alla colorazione con EBD sono state quantificate in due sezioni per ogni muscolo (n = 5 topi per ogni gruppo sperimentale) ed espresso come numero per mm<sup>2</sup> dell'area totale.

### **Reagenti e anticorpi**

L'oATP (Sigma-Aldrich, A6779-25MG) è stato ricostituito ad una concentrazione finale di 100 mmol/L in PBS e conservato a -80° C; il farmaco ricostituito è stato scongelato e diluito in PBS a 6 mmol /L immediatamente prima dell'uso.

Gli anticorpi e le diluizioni utilizzati nello studio sono i seguenti: anticorpo policlonale di coniglio diretto contro IL-6 (diluizione 1: 1000 per analisi Western blot, WB, Abcam). Anticorpo monoclonale di ratto purificato contro CD45 [diluizione 1:10 per immunoistochimica (IHC), BD Pharmingen]. Anticorpo di ratto purificato contro Foxp3 (diluizione 1:20 per IHC, eBioscience). Anticorpo monoclonale di ratto contro F4 / 80 (diluizione 1: 100 per IHC), anticorpo monoclonale di topo diretto contro la forma embrionale della catena pesante della miosina (e-MYHC) 1/2/3 (diluizione 1: 100 per IHC), anticorpo monoclonale di topo contro miogenina (diluizione 1: 100 per IHC), anticorpo policlonale di coniglio contro gliceraldeide fosfato deidrogenasi (GAPDH; diluizione 1: 500 per WB) e anticorpo policlonale di capra contro il connective tissue growth factor (CTGF; diluizione 1: 500 per WB) provenivano da Santa Cruz Biotechnology. Anticorpo policlonale di coniglio diretto contro il CD3 (diluizione 1:20 per IHC, Dako). Anticorpo policlonale di coniglio contro il Transforming Growth Factor (TGF)-b (diluizione 1: 1000 per WB), Cell Signaling Technology). IgG di coniglio anti-topo coniugato con perossidasi di rafano (HRP)(diluizione 1: 700 per WB, Dako), e IgG di asino anti-coniglio coniugato con HRP (diluizione 1: 5000 per WB), GE Healthcare. Il sistema di rilevamento della perossidasi/diaminobenzidina EnVision, di coniglio e topo, erano di Dako.

### **Studi istologici**

Sezioni di 7 µm di muscoli GN e tibiale anteriore (A.Tib.) isolati da topi *mdx* trattati con PBS, topi *mdx* trattati con oATP e topi Wt di controllo sono state tagliate con un criostato e successivamente colorate con colorazione ematossilina ed eosina standard (EE). Le aree trasversali (CSA) e i nuclei centralizzati sono stati quantificati in cieco in



tre sezioni per ogni muscolo (n = 5 topi per ogni gruppo sperimentale, n = da 400 a 600 miofibre) con il software ImageJ con un microscopio Imager M2 Axioplan.

La variabilità del calibro fibrale è stata calcolata secondo la formula:  $SDX1000 /$  diametro medio della fibra.

I diaframmi inclusi in paraffina isolati da topi *mdx* trattati con PBS, topi *mdx* trattati con oATP e topi Wt di controllo sono stati tagliati al microtomo (spessore 7  $\mu$ m). Dopo la deparaffinizzazione i vetrini sono stati colorati con EE.

### **Immunoistochimica**

Criosezioni spesse 5  $\mu$ m di muscoli GN e A.Tib. isolati da topi *mdx* trattati con PBS, topi *mdx* trattati con oATP e topi Wt di controllo sono stati fissati in acetone a -20 ° C per 10 minuti, lavati due volte in PBS, e poi in albumina di siero bovino (BSA) 4% in PBS per 5 minuti. Le sezioni sono state incubate in perossido di idrogeno 3% in BSA 8% in PBS per 10 minuti a temperatura ambiente e lavate per 5 minuti in BSA 8% in PBS. Dopo due lavaggi in BSA 4% in PBS (soluzione di bloccaggio), le sezioni sono state permeabilizzate in Triton X-100 0,3% in BSA 4% in PBS e incubate con anticorpi primari (per CD45, F4/80, Foxp3 e CD3) diluiti nella soluzione di bloccaggio per tutta la notte a +4° C. Il giorno successivo, le sezioni sono state lavate tre volte con BSA 4% in PBS e quindi incubate con anticorpo secondario Envision. Le sezioni sono state sciacquate tre volte con PBS (5 minuti ciascuno), ed il segnale è stato quindi rilevato mediante aggiunta del substrato diaminobenzidina (preparato fresco appena prima dell'uso). Le sezioni sono quindi state controcolorate con ematossilina, lavate con acqua deionizzata, e disidratate mediante il passaggio attraverso la scala di alcoli (70%, 90%, 95%, 100% e 100%) per 1 minuto ciascuno, ed il passaggio in due cambi successivi di xilene (3 minuti ciascuno), i vetrini sono infine stati chiusi con l'utilizzo di un montante specifico. I vetrini sono stati osservati sotto un microscopio Leica Diaplan (Leica). Il numero di cellule positive è stato contato in cieco nell'intera sezione. La superficie totale della sezione è stata misurata ed espressa in  $mm^2$ .

### **Real Time qPCR**

L'RNA totale è stato estratto dai muscoli GN (da 20 a 55 mg) isolati da topi *mdx* trattati con PBS, topi *mdx* trattati con oATP e topi Wt di controllo, o da frammenti di biopsie muscolari umane con l'utilizzo del kit RNeasy Lipid Tissue Mini (Qiagen) e secondo il

protocollo della ditta fornitrice (compreso il trattamento con DNase). La qualità e la quantità di RNA sono stati analizzati con uno spettrofotometro NanoDrop.

Il cDNA è stato sintetizzato a partire da 350 ng di RNA totale con il kit di sintesi di cDNA iScript (Bio-Rad Laboratories). Ogni campione di RNA è stato controllato per contaminazione da DNA genomico senza aggiunta di trascrittasi inversa nella miscela di sintesi del cDNA. Per la quantificazione del trascritto di *Foxp3* e *Amphyregulin* (*Areg*), Real Time PCR quantitativa (qPCR) è stata eseguita in triplice copia con 2X Sso Fast EvaGreen Supermix (Bio-Rad Laboratories) in una macchina CFX96 (Bio-Rad Laboratories). In breve, la miscela di PCR da 15  $\mu$ l conteneva cDNA diluito corrispondente a 8,75 ng di RNA totale e 0,2 mmol / L di ciascun primer. I livelli di espressione relativa sono stati normalizzati con il metodo comparativo Ct ( $\Delta\Delta$ Ct) con il gene housekeeping (*Gapdh*) dalla versione 3.1 del software di gestione CFX di Bio-Rad. Per ciascun set di primer specifico, l'efficienza era  $> 95\%$  e a un singolo prodotto è stato visto sull'analisi della curva di melting. Primer specifici per i trascritti esaminati (Tabella 3) sono stati disegnati mediante l'utilizzo del Software Beacon Designer 2.0. Per quantificazione del recettore P2X umano e murino, la real time qPCR è stata eseguita in triplice copia con 2X Sso Fast Probes Supermix (Bio-Rad Laboratories) in una macchina CFX96 (Bio-Rad Laboratories). La miscela di PCR da 15  $\mu$ l conteneva cDNA diluito corrispondente a 12,5 ng di RNA totale e set di primer / sonde premiscelati ordinati da Applied Biosystems. I livelli di espressione relativa sono stati normalizzati con il metodo  $\Delta\Delta$ Ct con il gene *Gapdh* e *Actina-1*, muscolo scheletrico (*ACTA1*, un gene muscolo specifico NM\_001272041.1), dal software di gestione CF-Bio-Rad.

### **Analisi Western Blot**

I campioni di tessuto sono stati preparati in ghiaccio come segue: da cinque a otto criosezioni da 10  $\mu$ m di spessore di muscoli GN e A.Tib isolati da topi *mdx* trattati con PBS, topi *mdx* trattati con oATP e topi Wt di controllo, sono stati rapidamente sciolti in 40 mL di tampone di lisi RIPA (Sigma-Aldrich) contenente un cocktail di inibitori delle proteasi 1:200 (Sigma-Aldrich). I lisati tissutali sono stati quindi sonicati per 10 secondi in ghiaccio e centrifugati a 10.621xg per 15 minuti a 4°C. I supernatanti sono stati raccolti e la concentrazione proteica è stata determinata mediante dosaggio di proteine Bradford (Bio-Rad Laboratories).

Uguali quantità di proteine totali (da 40 a 120 mg) sono state mescolate con il gel loading buffer (100 mmol / L Tris-HCl, pH 6,8, 400 mmol/L ditiotreitolo, 4% SDS, 0,2% bromofenolo blu e 20% glicerolo), e corse in un mini gel SDS-PAGE dal 6% al 15%, a 80 V per 2 a 2,30 ore in tampone per elettroforesi (25 mmol / L Tris, 250 mmol / L glicina e 0,1% SDS). Le proteine sono state quindi trasferite su membrane PVDF (Immobilon PVDF; Millipore).

Le membrane sono state bloccate con BSA al 5% in PBS / 0,1% Tween e incubate per 2 ore a temperatura ambiente con anticorpi primari tutti diluiti in BSA 1% / PBS.

Un anticorpo secondario coniugato con HRP è stato utilizzato per visualizzare gli anticorpi primari mediante un sistema di rilevazione della chemiluminescenza (Bio-Rad Laboratories). L'intensità delle bande è stata valutata mediante densitometria con l'uso del Sistema ImageQuant 350 (Amersham Biosciences).

### **Analisi statistica**

La maggior parte delle variabili analizzate non avevano una distribuzione normale come confermato dal test di Shapiro-Wilk; quindi, le differenze di parametri quantitativi tra due gruppi di topi sono state analizzate dal test U non parametrico. E' stato considerato come statisticamente significativo  $P < 0,05$ . I dati sono espressi come mediana, primo e terzo quartile (Qs) come descritto nei Risultati.

Per la distribuzione dell'area delle fibre (CSA), il numero di categorie e il range tra ogni classe è stato calcolato in base a Formula di Sturges. Le differenze tra i diametri fibrili corrispondente a ciascuna riga dei bin-limit sono stati valutati dal test  $\chi^2$  con un'ulteriore correzione (Bonferroni) per evitare errori di confronto multipli.

Tutte le correlazioni sono state valutate con il grado di Spearman coefficiente di correlazione dell'ordine ( $r_s$ ). Coefficienti di correlazione sono stati classificati come segue:  $r_s < 0,4$  = bassa, 0,4 a 0,80 = moderata e 0,80 = buona correlazione.

Per tutte le analisi statistiche è stato utilizzato il software Statistica versione 9.1 (StatSoft Co.). I grafici sono stati generati con il software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software).

	Accession number:	Primer sequences:	Amplicon size (bp):
mCd45-F	NM_001111316.2	5'-ATCTATCCCGCCCAGAATGG-3'	142
mCd45-R	NM_001111316.2	5'-TGCTGTCTTCCTGGGCTTTA-3'	
mF4/80-F	NM_010130.4	5'-CCCCAGTGTCTTACAGAGTG-3'	103
mF4/80-R	NM_010130.4	5'-GTGCCCAGAGTGGATGTCT-3'	
mEgr2-F	<u>NM_010118</u>	5'-GGACCCAGGTCTCATTCCTA-3'	120
mEgr2-R	<u>NM_010118</u>	5'-GAGTCCAGAGGACAGGGAAA-3'	
mCd3e-F	NM_007648.4	5'-AAGCCTGTGACCCGAGGAAC-3'	82
mCd3e-R	NM_007648.4	5'-CTGGGTTGGGAACAGGTGGT-3'	
mCd4-F	NM_013488.2	5'-GACAGTGTTCTTGCTTGCG-3'	85
mCd4-R	NM_013488.2	5'-GCACCTGACACAGCAGAGGA-3'	
mCd8a-F	NM_001081110.2	5'-ATGGCTTCATCCCACAACAAG-3'	78
mCd8a-R	NM_001081110.2	5'-CGTGTCCCTCATGGCAGAA-3'	
mFoxp3-F	NM_001199347	5'-CAGTCAAAGAGCCCTCACAA-3'	122
mFoxp3-R	NM_001199347	5'-AAGGCAGGCTCTTCATGTTT-3'	
mAreg-F	NM_009704	5'-AAGGAGGCTTCGACAAGAAA-3'	67
mAreg-R	NM_009704	5'-TTTACCCTGCATTGTCCTCA-3'	
mIl10-F	NM_010548	5'-CCCAGAAATCAAGGAGCATT-3'	129
mIl10-R	NM_010548	5'-TCACTCTTCACCTGCTCCAC-3'	
mMyog-F	NM_031189	5'- AGTGAATGCAACTCCCACAG-3'	143
mMyog-R	NM_031189	5'-CTGTCCACGATGGACGTAAG-3'	
mSpp1-F	NM_001204201	5'-TGACGATGATGATGACGATG-3'	144
mSpp1-R	NM_001204201	5'-GGGACGATTGGAGTGAAAGT-3'	

mIfng-F	NM_008337	5'-TCCTTTGGACCCTCTGACTT-3'	130
mIfng-R	NM_008337	5'-GTAACAGCCAGAAACAGCCA-3'	
mIl6-F	NM_001314054	5'-CTGGAGCCCACCAAGAACGA-3'	149
mIl6-R	NM_001314054	5'-TGTGAAGTCTCCTCTCCGGACT-3'	
mCtgf-F	NM_010217	5'-GAGTGTGCACTGCCAAAGAT-3'	102
mCtgf-R	NM_010217	5'-GGCAAGTGCATTGGTATTTG-3'	
mTgfb1-F	NM_011577	5'-CCCTATATTTGGAGCCTGGA-3'	141
mTgfb1-R	NM_011577	5'-CTTGCGACCCACGTAGTAGA-3'	
mTnf-F	NM_013693	5'-GACAGTGACCTGGACTGTGG-3'	133
mTnf-R	NM_013693	5'-TGAGACAGAGGCAACCTGAC-3'	
mGapdh-F	NM_008084	5'-AACTTTGGCATTGTGGAAGG-3'	71
mGapdh-R	NM_008084	5'-CCATCCACAGTCTTCTGGGT-3'	
mPpia-F	NM_008907	5'-TCCTGGCATCTTGTCCATGG-3'	79
mPpia-R	NM_008907	5'-TTCAGTCTTGGCAGTGCAGA-3'	
mRpl13a-F	NM_009438	5'-TCCGATAGTGCATCTTGGCC-3'	67
mRpl13a-R	NM_009438	5'-AAGTACCAGGCAGTGACAGC-3'	

Tabella 3. Sequenza dei primers per Real Time qPCR

#### 4. RISULTATI (*mdx*)

##### **La modulazione dei recettori P2X migliora i parametri biochimici e funzionali della progressione della malattia in topi *mdx* in vivo**

Inizialmente abbiamo caratterizzato il pattern di espressione dei diversi recettori P2X in pazienti con diversi gradi di deficit di distrofina. I livelli dei trascritti di P2X1-7 sono stati quantificati nelle biopsie muscolari di tre pazienti con Distrofia muscolare di Becker, la variante allelica più leggera di DMD e di sette casi DMD. La gravità della malattia è stata valutata secondo criteri istologici arbitrari (Tabella 4). In accordo con studi precedenti, i livelli di trascritti di P2X4 e P2X7 erano significativamente up-regolati in tutti i pazienti, sebbene a diversi livelli: i casi di distrofia muscolare di Becker hanno mostrato un aumento da 1,6 a 4,3 volte, mentre i pazienti affetti dalla forma più grave DMD presentavano un'induzione da 10,8 a 13 volte (Figura 1A). Analogamente, i trascritti di P2X4 e P2X7 erano incrementati nei GN isolati da topi *mdx* rispetto a topi Wt di controllo dello stesso sesso e della stessa età (Figura 1B). Allo scopo di ottenere un effetto antagonista su entrambi i recettori P2X, abbiamo quindi scelto di trattare i topi *mdx* con oATP, un composto descritto in origine come un antagonista irreversibile del recettore P2X7 [78], ma che in seguito è stato dimostrato essere in grado di bloccare anche altri sottotipi di P2X mostrando un miglioramento dell'immunopatologia in diversi modelli di infiammazione cronica [33-35,64,79].

L'efficacia del composto è stata prima testata in un trattamento a breve termine (2 settimane) alla concentrazione 6 mmol /L per via intraperitoneale su topi *mdx* maschi di 4 settimane di vita. Per questi esperimenti, abbiamo scelto come end-point la concentrazione di CK sierico poichè riflette e correla con la degenerazione muscolare attiva. Il trattamento con oATP ha portato ad una riduzione del 44% dei livelli di CK sierico in topi *mdx* trattati con oATP (mediana: 6030 U/L, primo - terzo Q: 4465 - 11.195 U/L; n = 10; P <0,043) rispetto a topi *mdx* trattati con PBS (mediana: 10.740 U /L, primo - terzo Q: 7460 - 33.480 U / L; n = 5) (Figura 2A).

Successivamente, sono stati trattati topi sottoposti ad esercizio fisico per quattro settimane consecutive alla stessa dose. Topi *mdx* iniettati con veicolo da solo e un gruppo di topi C57Bl/6 Wt della stessa età e sesso iniettati con il solo veicolo o oATP sono serviti come controllo. Come previsto dalla procedura operativa standard (SOP) di test farmacologici preclinici nel modello murino *mdx*, tutti i gruppi sperimentali sono stati sottoposti all'esecuzione di esercizio cronico con tapis roulant per tutto il periodo

di trattamento. I topi sono stati pesati all'inizio (linea di base) del trattamento e quindi con cadenza settimanale. Non è stata rilevata alcuna sostanziale differenza tra i vari gruppi.

Le concentrazioni sieriche di CK sono state valutate a metà e alla fine del trattamento; a 2 settimane, il trattamento con oATP ha ridotto la concentrazione di CK sierica del 44% (PBS-mdx: mediana: 2530 U/L, primo - terzo Q: 2225 - 3470 U/L; n = 5; oATP-mdx: mediana: 1420 U / L; primo - terzo Q: 945 - 1775 U / L; n = 5;  $P < 0,030$ ).

L'effetto è stato mantenuto a 4 settimane con una riduzione del 42% nel gruppo dei topi trattati con oATP (PBS-mdx: mediana: 3100 U / L; primo - terzo Q: 2315 - 4920 U/ L; n = 5; oATP-mdx: mediana: 1800 U/L; primo - terzo Q: 1610 - 1880 U/L; n = 5) (Figura 2B). Non è stato osservato alcun effetto di oATP sulle concentrazioni sieriche di CK nel gruppo dei topi Wt (PBS-Wt: mediana: 545 U/L, primo - terzo Q: 440 - 600 U/ L; n = 4; oATP-Wt: mediana: 655 U/L; primo - terzo Q: 575 - 670 U/L; n = 4).

La valutazione della resistenza alla fatica e della forza muscolare alla fine della seconda e quarta settimana di trattamento ha rivelato che l'oATP ha comportato un miglioramento delle prestazioni funzionali con test di hangwire e capacità aerobica (numero di fermate durante il test di corsa) rispetto ai topi trattati con PBS (Figura 3).

### **La modulazione dei recettori P2X migliora la funzionalità strutturale nei topi *mdx* in vivo**

Le analisi istologiche mediante colorazione EE sono state completate su GN, A.Tib. e diaframmi. Nei topi *mdx* trattati con PBS è stato osservato uno stato muscolare degenerato, con diversi segni di danno miopatico, compresa la degenerazione delle fibre muscolari con nuclei centralizzati, aumentata variabilità nel diametro della fibra, e presenza di infiammazione. L'antagonismo P2X ha portato a diminuzione del numero e dell'area delle reazioni infiammatorie attorno alle cellule muscolari in necrosi, che ha raggiunto una significatività statistica nei muscoli A.Tib. (Figura 4). L'effetto benefico dell'antagonismo purinergico era associato a una riduzione dei nuclei centralizzati in tutti i siti muscolari indagati (Figura 5A). Quando è stata studiata la distribuzione delle frequenze dell'area della sezione delle fibre (Cross Sectional Area, CSA), nei topi trattati con oATP è stata osservata una diminuzione dell'eterogeneità di CSA rispetto ai topi *mdx* trattati con PBS, il cui diametro più grande rappresenta un segno di degenerazione (ipertrofia patologica) (Figura 5B). Nel gruppo dei topi *mdx* trattati con oATP, infatti, i valori di CSA hanno mostrato uno spostamento verso i valori osservati

nei topi Wt (Figura 5B) e mostrano una diminuzione del 12,8% nei tibiali anteriori e del 36,7% nei diaframmi di variabilità delle dimensioni delle fibre,  $P < 0,01$ .

Per analizzare ulteriormente l'entità del danno della membrana muscolare e la degenerazione della miofibra, è stato utilizzato il colorante vitale EBD. Questa molecola non è in grado di attraversare la membrana, per cui la fibra muscolare non si colora a meno che l'integrità della membrana del muscolo scheletrico non sia danneggiata. L'analisi al microscopio, di sezioni di muscolo scheletrico di topi trattati con iniezione intraperitoneale di EBD 20 ore prima del sacrificio, ha evidenziato una riduzione del 48% delle fibre positive (segnale autofluorescente rosso) in topi mdx trattati con oATP (PBS-mdx: mediana: 0,95 miofibre EBD+/mm<sup>2</sup>; primo - terzo Q: 0,80 - 1,61 miofibre EBD+/mm<sup>2</sup>; n = 5; oATPmdx: mediana: 0,50 miofibre EBD+/mm<sup>2</sup>; primo - terzo Q: 0,21 - 1,08 miofibre EBD+/mm<sup>2</sup>; n = 5) (Figura 6).

### **La modulazione dei recettori P2X riduce la gravità della risposta innata infiammatoria in topi mdx in vivo**

L'effetto di oATP sulla composizione delle cellule immunitarie degli infiltrati infiammatori reattivi è stato valutato mediante immunocolorazione su sezioni di muscolo GN e A.Tib. con anticorpo anti-CD45 (marcatore linfatico/monocitico) e anti-F4 / 80 (marcatore macrofagico).

Le cellule positive sono state contate manualmente nell'intera area della sezione di tessuto per ogni topo ed espressa come numero di cellule positive per millimetro quadrato (mm<sup>2</sup>).

La somministrazione di oATP ha portato ad una diminuzione del 43% del numero di cellule CD45+ infiltranti i muscoli e del 31% dei macrofagi F4/80+ (Figura 7A-B) [31,34]. Gli effetti benefici di oATP sull'infiammazione del tessuto si sono riflessi anche sulle concentrazioni di proteina IL-6, che sono risultate significativamente ridotte in topi trattati con oATP mediante analisi all'immunoblot (Figura 7C).

### **Espansione delle Treg in topi mdx trattati con oATP e miglioramento della rigenerazione muscolare**

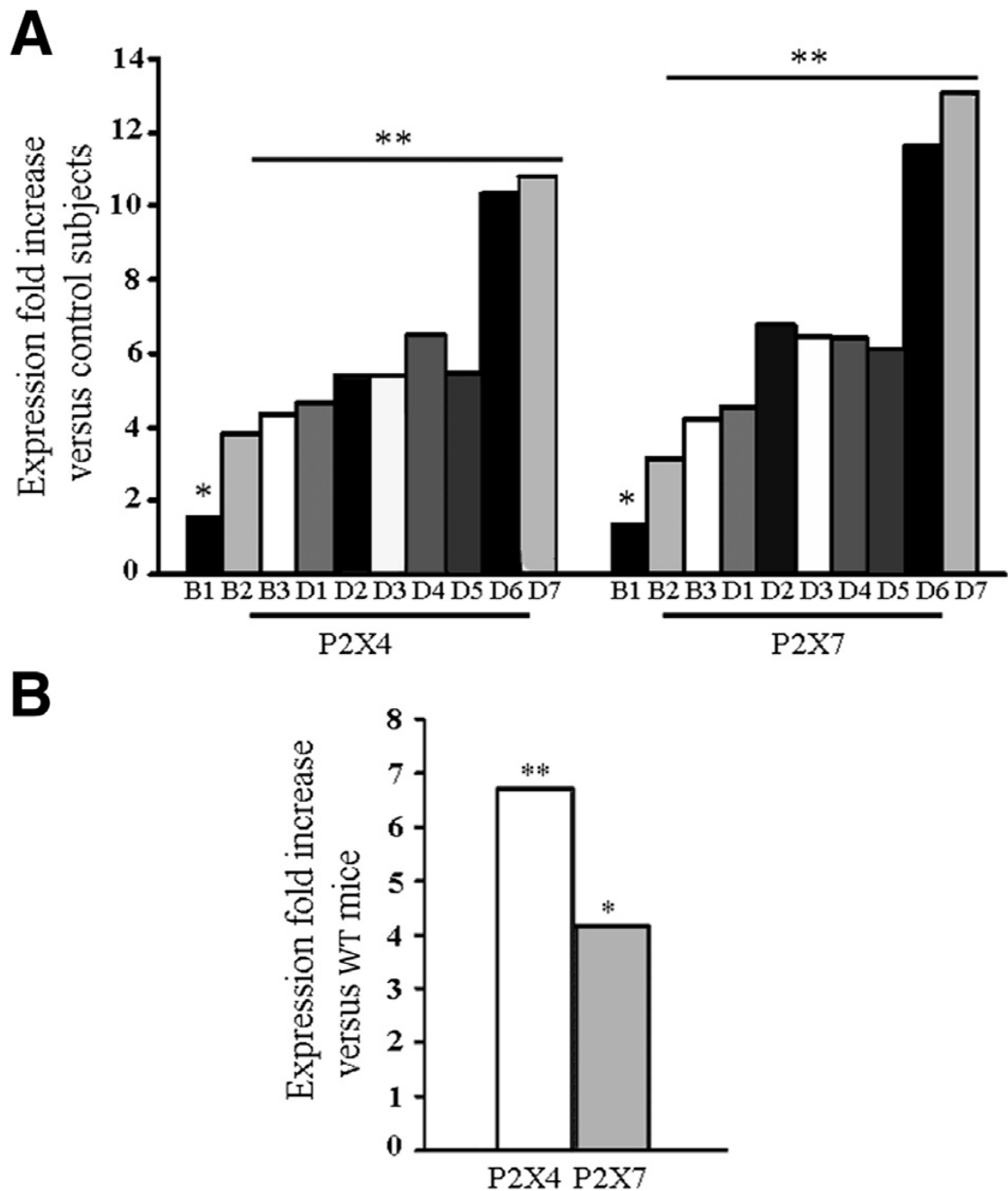
E' stata osservata una riduzione del 24% di cellule T CD3+ infiltranti i muscoli in topi mdx trattati con oATP (Figura 8A-B). Tuttavia, nonostante la diminuzione delle cellule T, le cellule Foxp3+ sono risultate significativamente incrementate all'IHC in topi mdx trattati con oATP rispetto a topi mdx trattati con PBS, indicando che l'antagonismo



farmacologico del recettore P2X ha portato all'arricchimento di Treg nel muscolo scheletrico *mdx* (Figura 8A-B). L'aumento di Tregs tra le cellule T infiltranti è stato ulteriormente confermato dalla quantificazione dei livelli di trascrizione di Foxp3 e Areg, un fattore di crescita che viene espresso da una popolazione di Treg rilevata nel tessuto muscolare. Areg è sovraregolato durante l'infiammazione e partecipa alla difesa e riparazioni (Figura 8C) [44].

Poiché Areg ha mostrato un effetto diretto sulla rigenerazione delle miofibre, il numero di cellule rigenerative nei due gruppi sperimentali sono stati quantificati mediante immunocolorazione per e-MYHC. Le miofibre e-MYHC<sup>+</sup> sono state contate manualmente nell'intera area delle sezioni per ogni topo ed espresse come numero di cellule rigenerative per millimetro quadrato (mm<sup>2</sup>). In particolare, l'oATP ha indotto un aumento di 10 e 3.4 volte del numero di cellule rigenerative, rispettivamente, nel muscolo GN e A.Tib. (Figura 9A-B) e il numero di cellule Foxp3<sup>+</sup> e eMYHC<sup>+</sup> sono significativamente correlate ( $rs=0.80$ ;  $n = 4$  topi per gruppo sperimentale).

In base ai risultati e-MYHC, diaframmi isolati da topi *mdx* trattati con oATP visualizzati a 2,6 volte aumento di cellule positive per miogenina (un marker di precoce differenziare i mioblasti) (Figura 9A-B). Viceversa a questa immagine pro-rigenerativa, il blocco P2X portato ad una riduzione dei fattori fibrogenici, che alla fine stimolare la fibrosi endomisiale e la sostituzione connettiva di tessuto muscolare. I livelli di proteine TGF- $\beta$  e CTGF sono stati quantificati in lisati muscolari totali isolati da GN di Wt, topi *mdx* trattati con PBS e *mdx* trattati con oATP ( $n = 3$  per ogni gruppo sperimentale). Come previsto, i livelli di proteina TGF- $\beta$  sono aumentati in topi *mdx* non trattati rispetto ai topi Wt [37]. Tuttavia, questo effetto è stato ridotto del 40% nel gruppo trattato con oATP. Un risultato simile è stato osservato per CTGF, uno effettore a valle del TGF- $\beta$ , che è stato ridotto del 60% (Figura 9C). Questi risultati suggeriscono che l'antagonismo farmacologico del P2X può migliorare la rigenerazione nel muscolo distrofico e si correla con l'incremento della funzione Treg.



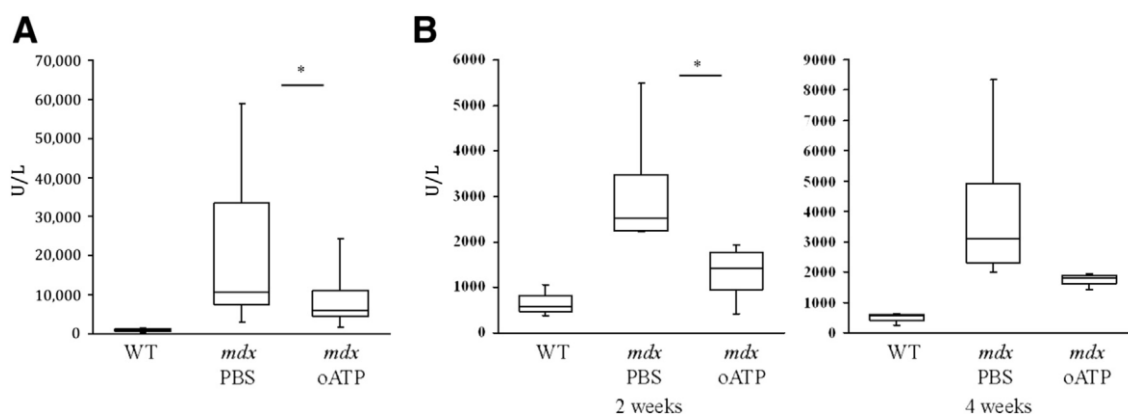
**Figura 1.**

I recettori P2X4 e P2X7 sono up-regolati in tessuto muscolare di pazienti affetti da BMD e DMD così come in gastrocnemio di topi *mdx*.

A e B: RNA totale estratto da biopsia muscolare di tre pazienti BMD (B1 - B3), sette pazienti DMD (D1 - D7) e tre soggetti di controllo, e dal muscolo gastrocnemio (GN) di cinque topi *mdx* e quattro topi Wt della stessa età e dello stesso sesso.

I trascritti di P2X4 e P2X7 sono stati quantificati mediante real-time PCR.

GAPDH e ACTA1 sono i geni di controllo utilizzati. I dati sono espressi come incremento rispetto alla media dei controlli. L'analisi statistica è stata eseguita con il test U. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01.



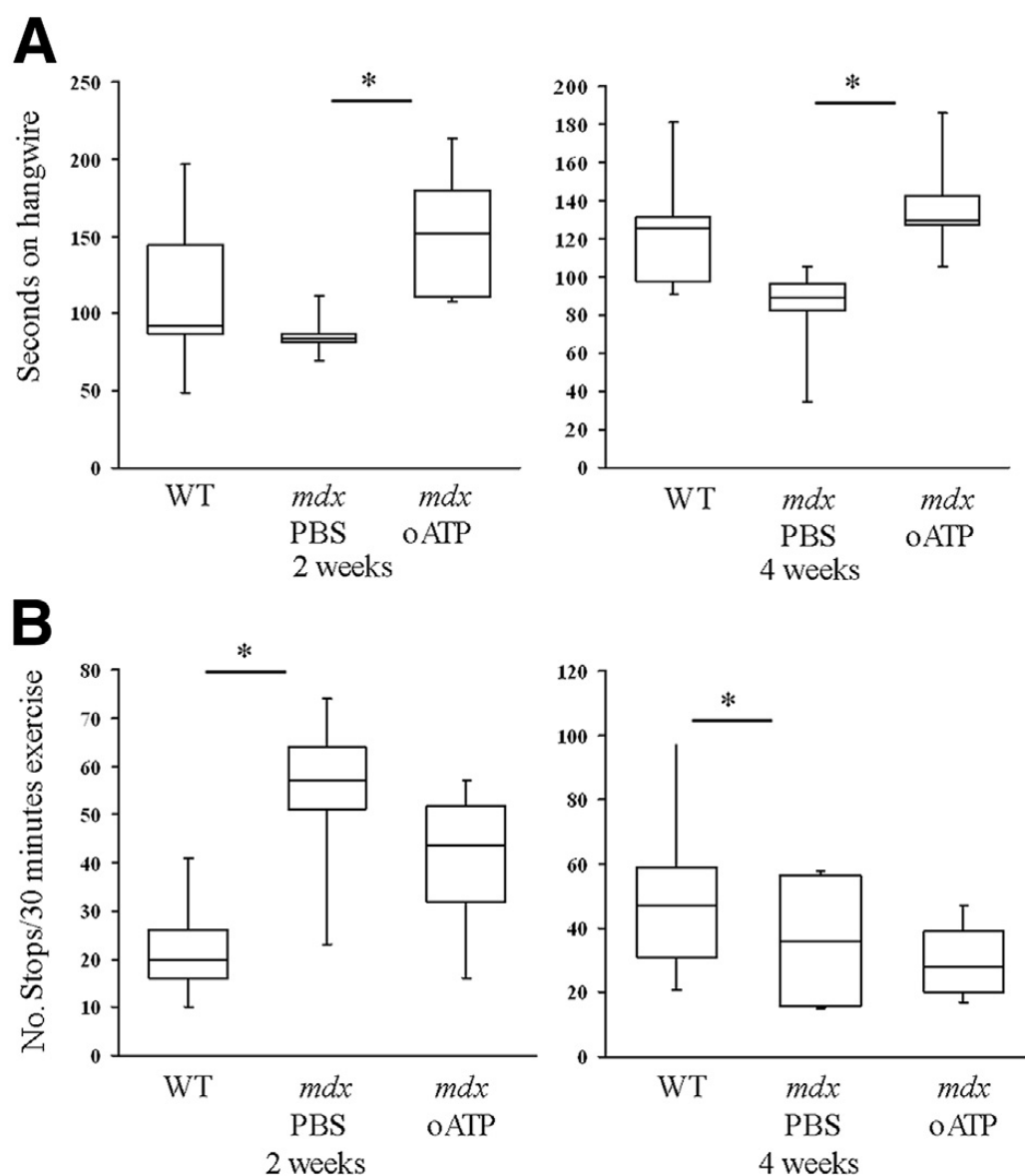
**Figura 2.**

Il trattamento con oATP reduce i livelli di CK sierico sia nei topi mdx a riposo che nei topi mdx sottoposti ad esercizio.

A: Valutazione dei livelli di CK sierico dopo trattamento a breve termine (2 settimane). Campione di sangue ottenuto da topi mdx oATP, mdx PBS, e topi Wt alla fine del trattamento. n = 4 - 8 topi.

B: Valutazione dei livelli di CK sierico dopo trattamento per 4 settimane, quando tutti i gruppi sperimentali erano sottoposti ad esercizio fisico. Campione di sangue ottenuto da topi mdx oATP, mdx PBS, e topi Wt alla fine della seconda e della quarta settimana di trattamento. n = 5 topi.

L'analisi statistica è stata eseguita con il test U. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01.



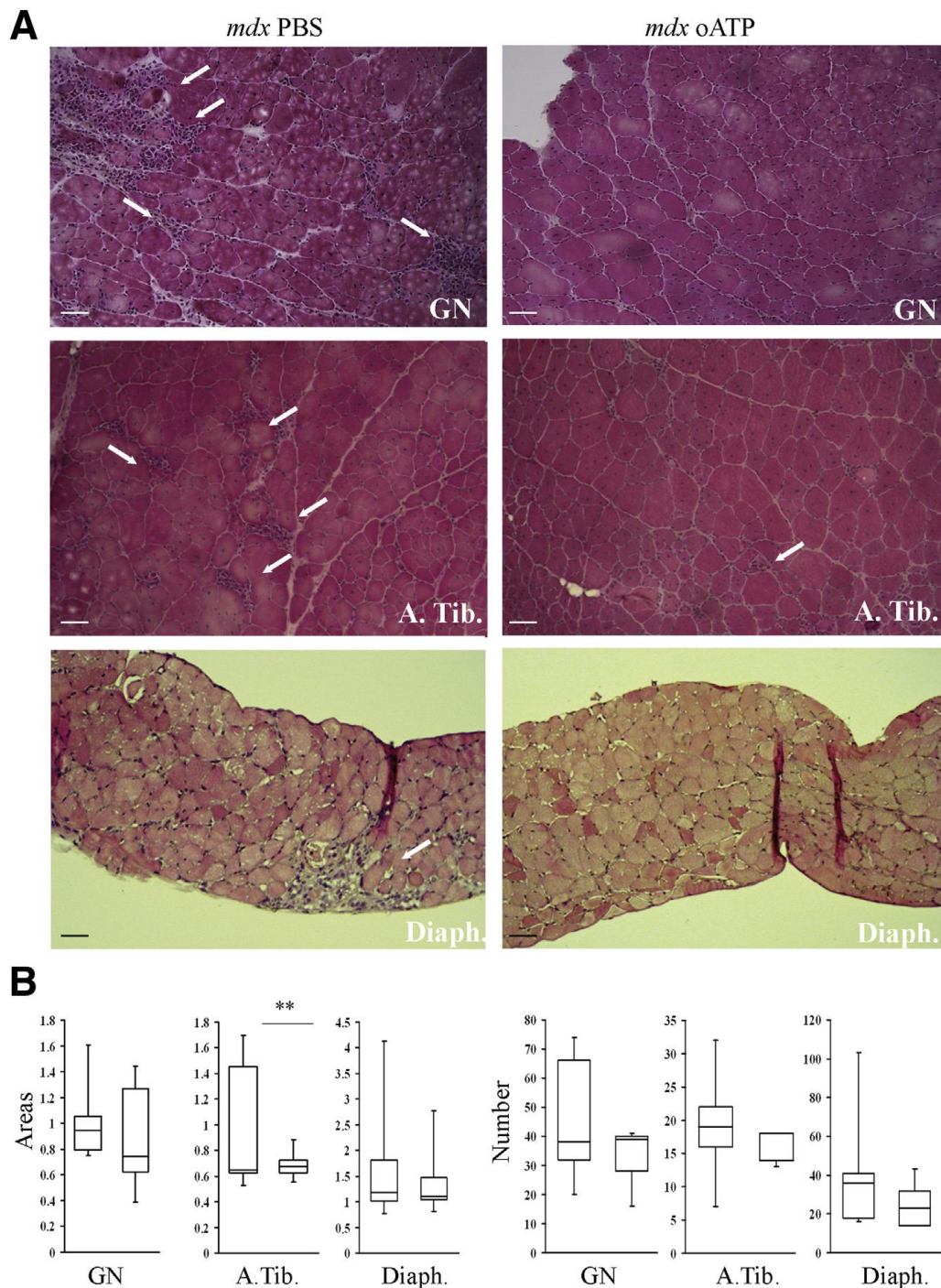
**Figura 3.**

Il trattamento con oATP migliora la forza muscolare e la resistenza alla fatica nei topi *mdx*.

A: Four Limb Hanging Test eseguito su topi *mdx* oATP, *mdx* PBS, e topi di controllo alla fine della seconda e della quarta settimana di trattamento.

B: Treadmill test eseguito su topi *mdx* oATP, *mdx* PBS, e topi di controllo durante tutta la durata del trattamento. Alla fine della seconda e della quarta settimana di trattamento è stato misurato il numero di fermate durante la corsa. n = 5 topi.

L'analisi statistica è stata eseguita con il test U. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01.

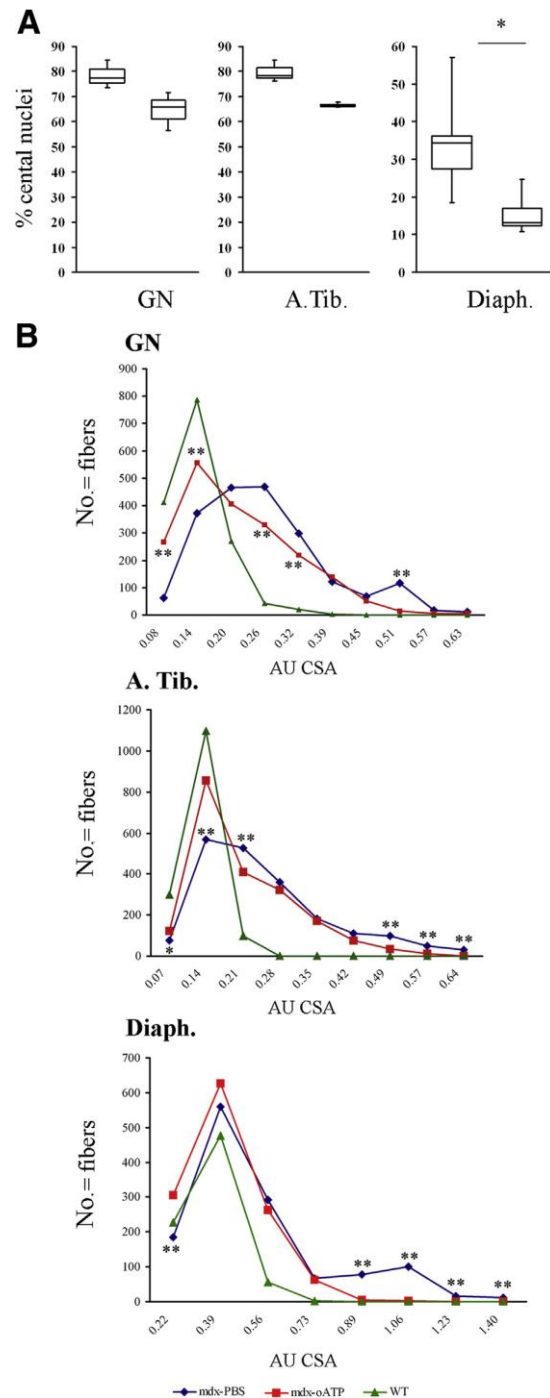


**Figura 4.**

Il trattamento con oATP migliora l'estensione dell'infiltrato infiammatorio in topi *mdx*.

A: Sezioni di muscolo congelato: gastrocnemio (GN), tibiale anteriore (A.Tib.) e diaframma (Diaph.) di topi *mdx* trattati con oATP e trattati con PBS raccolti alla fine della quarta settimana di trattamento e colorati con EE. Le frecce bianche indicano gli infiltrati infiammatori. Ingrandimento 10X.

B: Grafici rappresentanti l'area/mm<sup>2</sup> dell'area totale della sezione e il numero totale degli infiltrati infiammatori. L'analisi statistica è stata eseguita con il test U. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01.



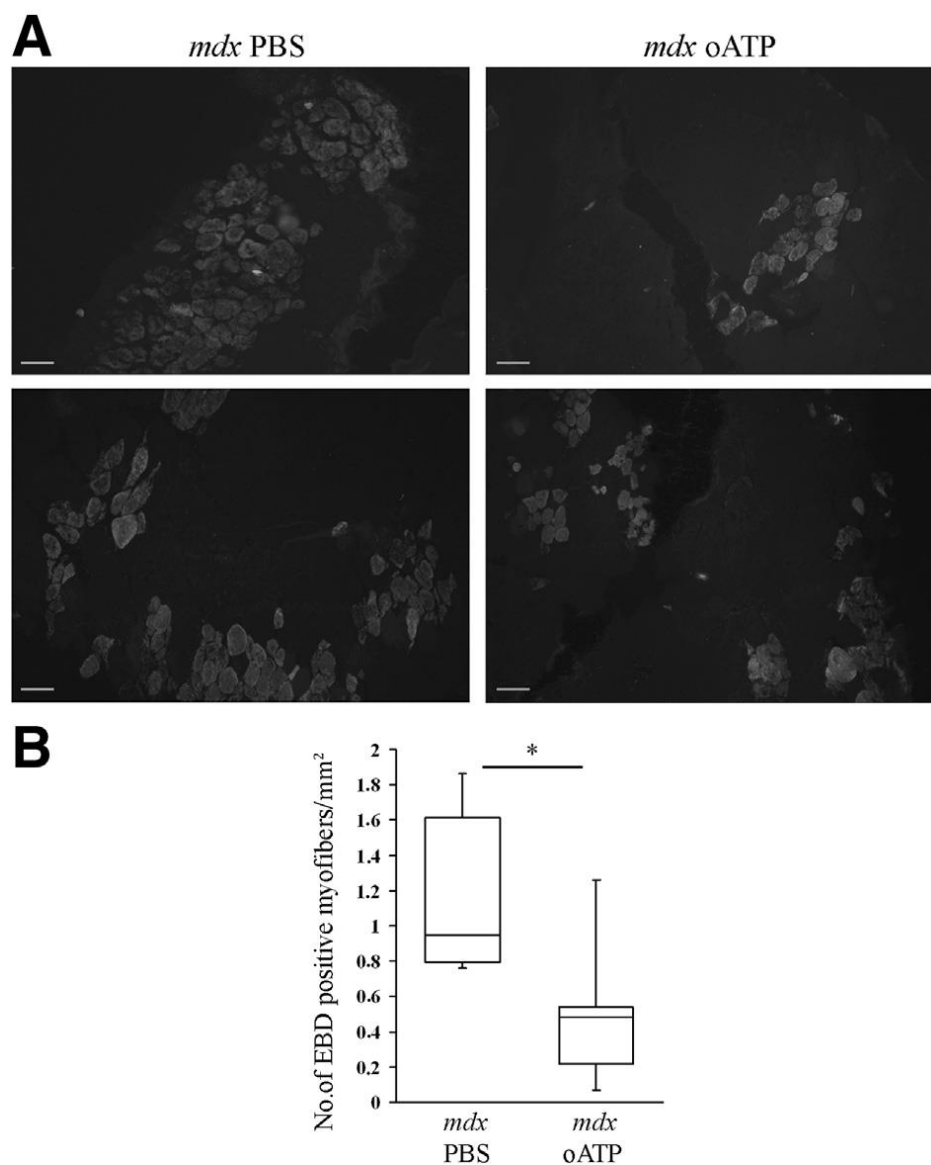
**Figura 5.**

Il trattamento con oATP migliora il fenotipo distrofico in topi *mdx*.

A: Il numero dei nuclei centralizzati è stato contato in 600 fibre di tre sezioni consecutive di ogni muscolo: gastrocnemio (GN), tibiale anteriore (A.Tib.), e diaframma (Diaph.) ed espresso in percentuale rispetto al numero di nuclei totali.

B: la distribuzione dell'area della sezione (CSA) è stata valutata in tre sezioni consecutive nei muscoli GN, A.Tib., e Diaph. Di topi *mdx* trattati con oATP (linea verde), *mdx* trattati con PBS (linea rossa) e Wt (linea blu). n = 5 topi per gruppo

sperimentale. L'analisi statistica è stata eseguita col test C2 con correzione di Bonferroni. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .



**Figura 6.**

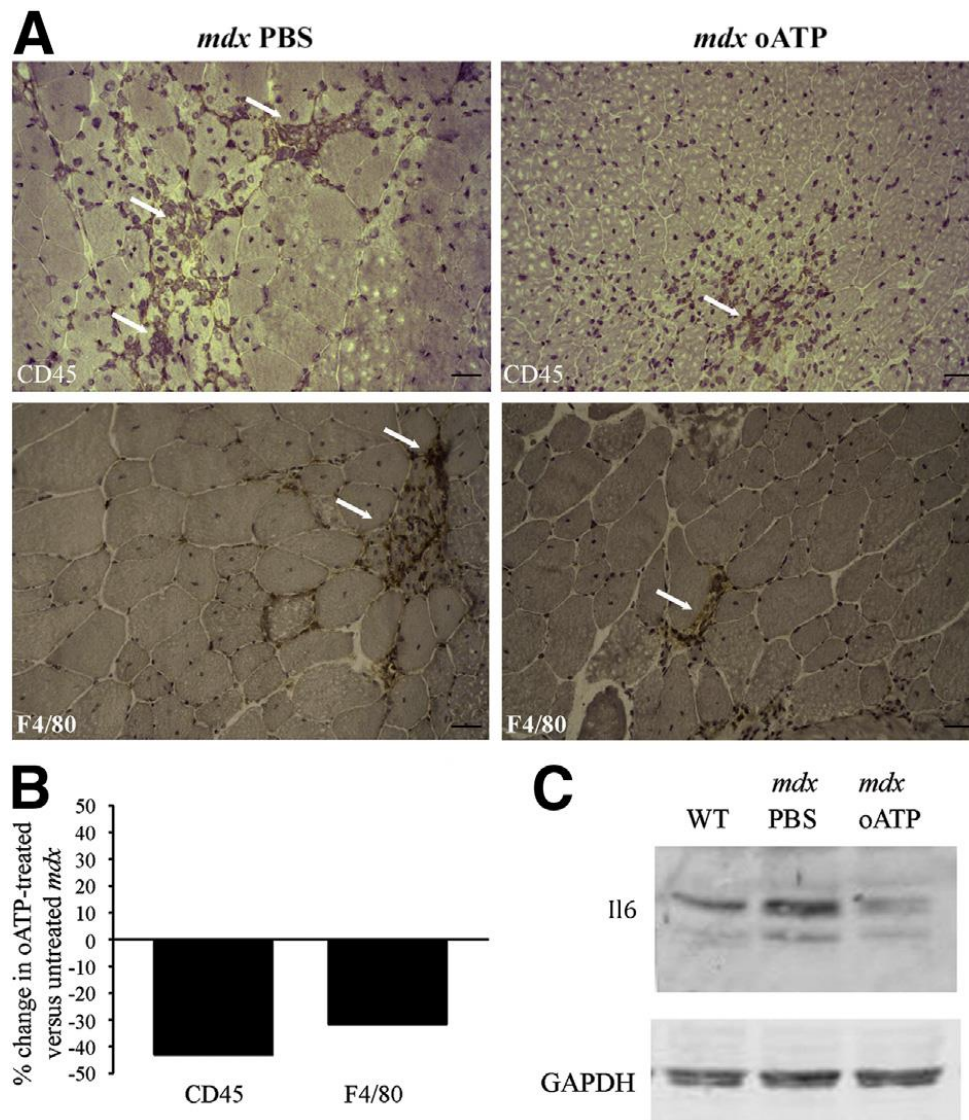
Il trattamento con oATP reduce la degenerazione muscolare e le caratteristiche necrotiche dei topi mdx

A: EBD è stato iniettato in topi mdx trattati con PBS e topi mdx trattati con oATP 20 ore prima del sacrificio per valutare il danno della fibra muscolare. Sezioni congelate di GN sono state osservate in fluorescenza. Le miofibre danneggiate emettono un segnale autofluorescente rosso che risultava ridotto nei topi mdx trattati con oATP. Ingrandimento 10X.



B: le fibre positive per EBD sono state quantificate nell'intera area di due sezioni per ogni muscolo ed espresso come numero di fibre positive/mm<sup>2</sup> di area totale della sezione. N=5 topi per gruppo sperimentale.

L'analisi statistica è stata eseguita con il test U. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01.



**Figura 7.**

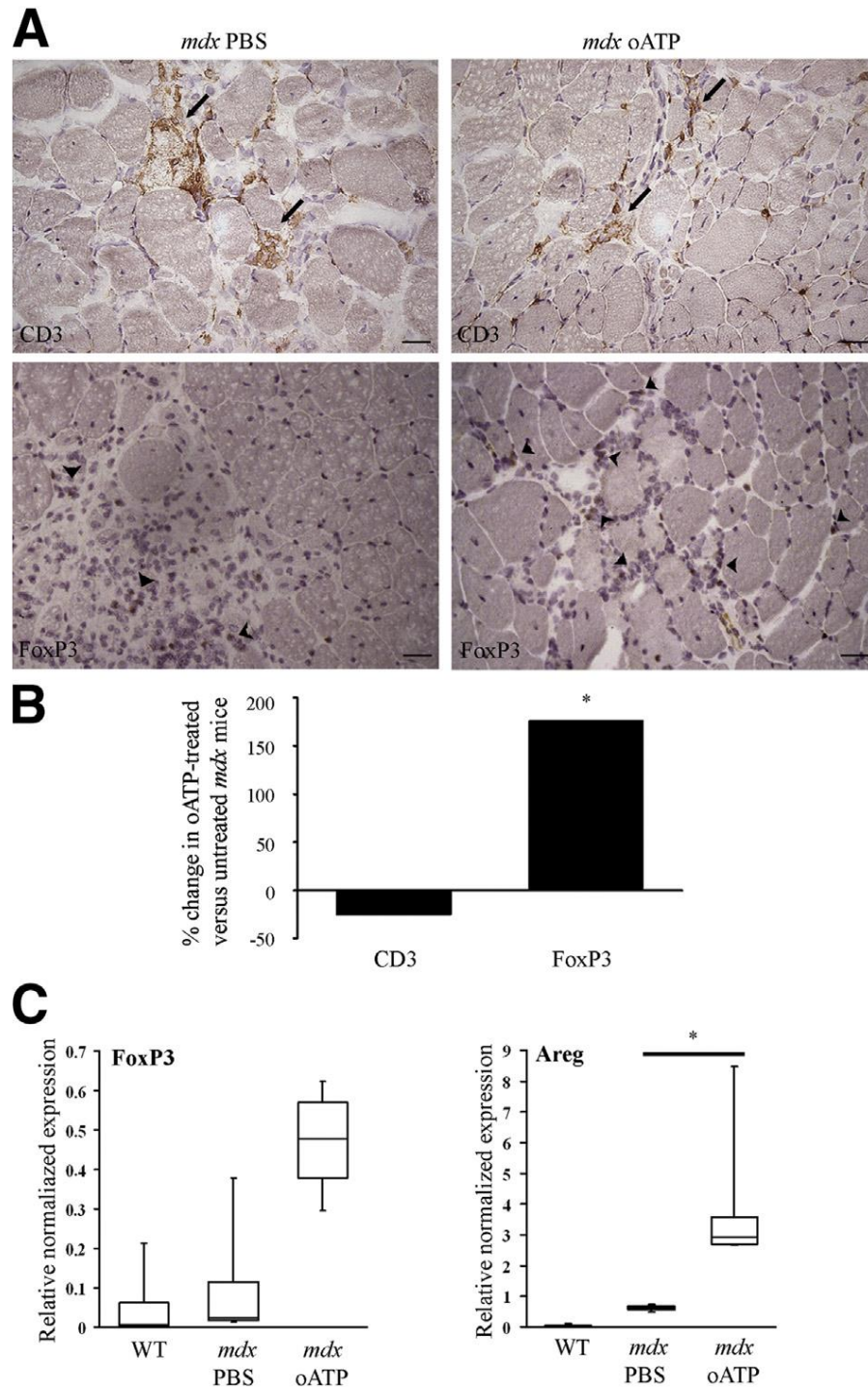
Effetto del trattamento con oATP sull'immunità innata in topi *mdx*.

A: Sezioni di muscolo congelato GN e A.Tib. di topi *mdx* trattati con oATP e topi *mdx* trattati con PBS sono stati immunomarcati con anticorpi per CD45 e F4/80 (freccie bianche). Immagini rappresentative di GN. Ingrandimento 20X.

B: Nei GN, le fibre positive per CD45 e F4/80 sono state quantificate nell'intera sezione di tessuto ed espresse come numero di cellule positive/mm<sup>2</sup> di area totale della sezione. N=3 topi per gruppo sperimentale.



C: immunoblot di lisato muscolare di GN di topi mdx trattati con oATP e topi mdx trattati con PBS marcato con anticorpo anti- IL-6. L'espressione di GAPDH è utilizzata come proteina di controllo.



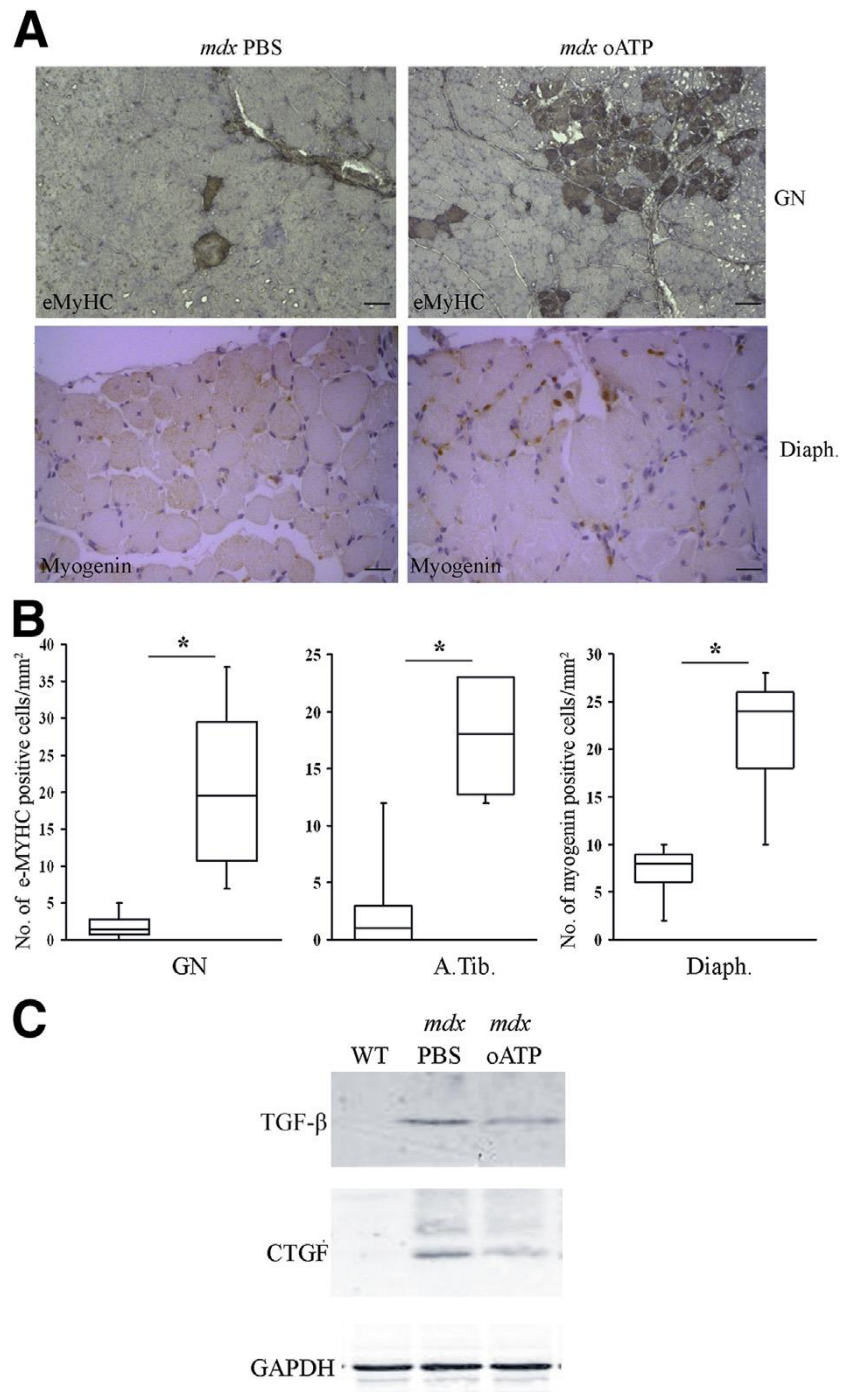
**Figura 8.**

Effetto del trattamento con oATP sull'immunità adattativa in topi mdx.

A: Sezioni di muscolo congelato GN e A.Tib. di topi mdx trattati con oATP e topi mdx trattati con PBS sono stati immunomarcati con anticorpi per CD3 (freccie nere) e Foxp3 (freccie bianche). Immagini rappresentative di GN. Ingrandimento 20X.

B: Nei GN, le fibre positive per CD3 e Foxp3 sono state quantificate nell'intera sezione di tessuto ed espresse come numero di cellule positive/mm<sup>2</sup> di area totale della sezione. N=3 topi per gruppo sperimentale.

C: l'RNA totale è stato estratto da muscolo GN isolato da topi mdx trattati con oATP e topi mdx trattati con PBS. I livelli dei trascritti di Foxp3 e Areg sono stati quantificati mediante Real-time PCR. N=5 topi per gruppo sperimentale. L'analisi statistica è stata eseguita con il test U. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01.



**Figura 9.**

Il trattamento con oATP aumenta la rigenerazione muscolare e inibisce l'espressione dei fattori profibrotici TGF- $\beta$  e CTGF.

A: Sezioni di muscolo congelato GN e A.Tib. di topi *mdx* trattati con oATP e topi *mdx* trattati con PBS sono stati immunomarcati con anticorpi per e-MyHC. Sono mostrate immagini rappresentative di GN. Ingrandimento 20X. Sezioni di diaframmi inclusi in paraffina di topi *mdx* trattati con oATP e topi *mdx* trattati con PBS sono state immunomarcate con anticorpo per miogenina.

B: le fibre positive per e-MyHC e miogenina sono state quantificate nell'intera sezione di tessuto.

C: immunoblot di lisato muscolare di GN di topi mdx trattati con oATP e topi mdx trattati con PBS marcato con anticorpo anti- TGF- $\beta$  e CTGF. L'espressione di GAPDH è utilizzata come proteina di controllo.

#### **4. RISULTATI (Sgca)**

Allo scopo di definire il ruolo del signalling di eATP nella patologia da deficit di a-SG, lo stesso tipo di esperimenti e trattamento sono stati condotti sul topo Sgca, modello murino di LGMD2D. Per prima cosa è stato valutato il pattern di espressione dei recettori P2X (P2XR) in lisati muscolari di gastrocnemi di topi Sgca e di topi di controllo wild-type della stessa età. Come è stato osservato nel modello animale *mdx*, abbiamo osservato un incremento specifico dei trascritti dei recettori P2X4 e P2X7 (Figura 10). Questo effetto era associato ad un incremento di markers molecolari di Tregs quali Foxp3, Areg, Il10 e CD39 (Figura 11).

Animali Sgca di 4 settimane di vita (gentilmente donate dal Prof. Giulio Cossu) sono stati trattati ogni giorno con ATP ossidato (oATP) alla dose di 6 mM mediante iniezione intraperitoneale (i.p.) per 4 settimane. Altri topi Sgca sono stati iniettati con il solo diluente (PBS) e un gruppo di topi Wt C57Bl/6 della stessa età e dello stesso sesso è stata utilizzata come controllo (Figura 12A). I nostri dati precedenti hanno confermato che il trattamento con oATP non ha effetti sul muscolo di topi Wt.

Il trattamento è stato ripetuto in due diversi esperimenti, ciascuno della durata di 4 settimane, e ciascuno includeva un numero di 5 - 7 topi per ogni gruppo sperimentale. I risultati, quindi, sono indicativi di almeno n=10 animali per gruppo. I dati sono espressi come mediana  $\pm$  primo e terzo quartile. L'analisi statistica è stata eseguita con il test di U-Mann Whitney per dati non parametrici.

I topi sono stati pesati all'inizio del trattamento e poi con cadenza settimanale. Non è stata osservata alcuna differenza significativa tra i diversi gruppi sperimentali (dati non mostrati). La valutazione della forza muscolare è stata eseguita con il test Four Limb Hanging Test all'inizio del trattamento (tempo 0) e alla fine di ogni settimana. Come atteso, in base ai dati descritti in letteratura, il gruppo dei topi non trattati mostrava un progressivo peggioramento della forza muscolare durante il tempo, mentre il gruppo dei topi Sgca trattati con oATP si manteneva sui livelli registrati al tempo 0 (Figura 12B). I livelli di CK sierico sono stati valutati su sangue prelevato con puntura intracardiaca al

termine del trattamento. Il trattamento con l'antagonista del P2X determinava una riduzione del 35% dei livelli di CK (Figura 12C).

### **La modulazione dei recettori P2X determina un miglioramento delle caratteristiche morfologiche in topi Sgca in vivo.**

Analisi istologiche sono state condotte su sezioni di muscolo gastrocnemio e diaframma. Nei gastrocnemi i livelli di reazione infiammatoria sono stati valutati mediante colorazione con fosfatasi acida, che è positiva in macrofagi attivati e in miofibre in degenerazione o necrosi. Sono state quantificate sia la percentuale di area coinvolta che l'intensità della colorazione in topi trattati e non trattati. Entrambi i parametri risultavano fortemente positivi nei topi non trattati, come si può osservare dalla colorazione in rosso, e diminuivano rispettivamente del 30 e del 35% nei topi trattati con oATP (Figura 13A-B). Anche la percentuale di nuclei centralizzati, indice di alterazioni patologiche specifiche della fibra muscolare, risultava ridotta del 15% in seguito al trattamento (Figura 14A). Questi risultati sono in accordo con la quantifica dei livelli dei trascritti di miogenina nel muscolo. Questo fattore di trascrizione muscolo-specifico risultava incrementato nel tessuto muscolare di topi Sgca non trattati rispetto ai livelli espressi nei topi Wt, ma si riduceva del 65% in seguito a trattamento con oATP, suggerendo un'inibizione dei cicli di degenerazione/rigenerazione a cui è sottoposto il muscolo in condizioni patologiche (Figura 14B).

### **La modulazione dei recettori P2X determina una riduzione della risposta immunitaria innata e adattativa in vivo.**

L'effetto del trattamento con oATP sulla risposta immunitaria innata e adattativa nel muscolo scheletrico dei topi Sgca è stato valutato mediante:

-determinazione dei livelli dei trascritti di Il-1b, Il-6, IFNg e TNFa su muscolo. Come nel modello *mdx*, queste citochine risultavano incrementate nel tessuto muscolare dei topi Sgca non trattati rispetto agli animali Wt, ma diminuivano rispettivamente del 50, 55, 50, 65% in seguito a trattamento con oATP (Figura 15).

-immunoistochimica e quantifica di leucociti CD45 infiltranti il tessuto muscolare. Il segnale positivo CD45, nelle sezioni di muscolo gastrocnemio, è stato osservato in differenti siti di risposta infiammatoria, prevalentemente intorno a fibre necrotiche. Tale segnale è stato quantificato mediante un microscopio automatico sull'intera sezione

muscolare, e la percentuale di cellule positive nell'area totale, risultava ridotta del 45% nei topi trattati con oATP (Figura 16A-B).

- valutazione dei livelli proteici di Asc1, un elemento del complesso dell'inflammasoma. Benchè non presente in topi Wt, Asc1 era marcatamente espresso nel lisato muscolare di topi Sgca ed era significativamente inibito in seguito al trattamento con inibitori dei P2X (Figura 16C).

- immunoistochimica e quantifica di linfociti CD3 infiltranti il tessuto muscolare. Il segnale positivo CD3 è stato quantificato mediante un microscopio automatico sull'intera sezione muscolare, e la percentuale di cellule positive nell'area totale, risultava ridotta del 19% nei topi trattati con oATP (Figura 17A-B).

- determinazione dei livelli dei trascritti di marker molecolari di Treg nei lisati muscolari. L'espressione di Foxp3 era incrementata del 25% nel tessuto muscolare di topi Sgca trattati con oATP quando comparata coi topi Sgca non trattati (Figura 17C).

### **La modulazione dei recettori P2X determina una riduzione della trascrizione di fattori pro-fibrotici muscolari in vivo.**

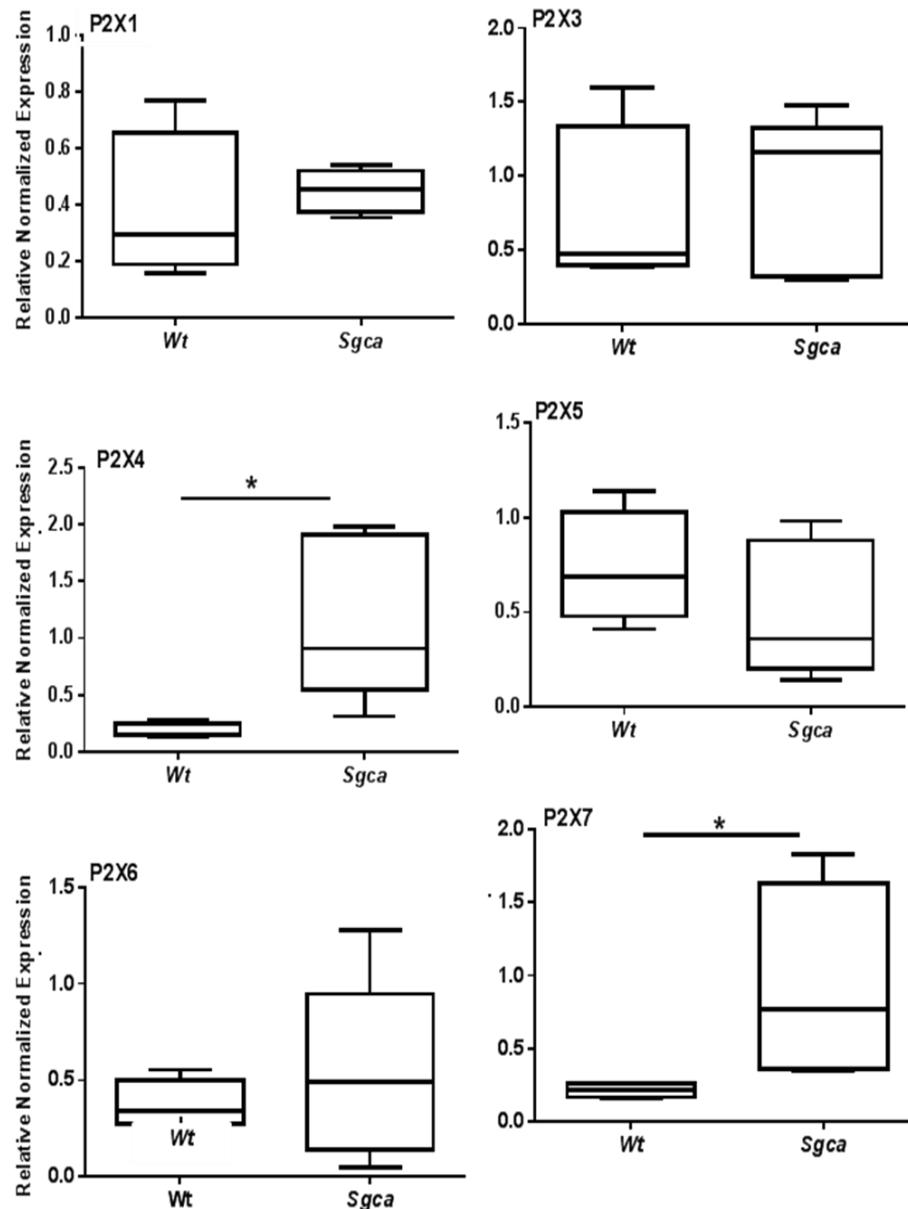
In accordo con l'aspetto anti-infiammatorio, il blocco dei recettori P2X determina una riduzione della trascrizione di fattori fibrogenici, che stimolano fibrosi endomisiale e determinano una progressiva sostituzione del tessuto muscolare con quello connettivale. I livelli di espressione di osteopontina, CTGF e TGF-beta erano incrementati nel tessuto muscolare di topi Sgca non trattati rispetto ai Wt. Questo effetto era ridotto rispettivamente del 36, 32, e 73% nel gruppo degli animali trattati (Figura 18). Gli effetti del trattamento con oATP sul collagene di tipo I e sul TGF-beta sono stati ulteriormente confermati a livello proteico. L'antagonista dei recettori P2X antagonism preveniva l'up-regolazione di collagene di tipo I che si osservava nel gruppo degli animali non trattati e determinava una riduzione di entrambe le isoforme del TGF-beta, quella dimerica di 25 kDa e quella attiva monomerica di 15 kDa (Figura 19A). Le analisi istologiche eseguite su sezioni di gastrocnemio con colorazione tricromica di Masson, colorazione utilizzata per evidenziare il tessuto connettivo, hanno mostrato che il trattamento con oATP determina una riduzione del 20% dell'area positiva alla colorazione (Figura 19B-C).

Nei diaframmi, l'antagonismo dei recettori P2X determina una riduzione, rispettivamente del 66 e del 42% delle aree e del numero degli infiltrati infiammatori, ed una riduzione del 22% del numero dei nuclei centralizzati (Figura 20).

Infine, la colorazione con Rosso PicroSirius che si lega al collagene, mostra come, il trattamento con oATP, determini una riduzione sia della percentuale di area positiva alla colorazione, sia di intensità della colorazione del tessuto fibrotico, rispettivamente del 57 e del 49% (Figura 21).

Con questi dati, abbiamo dimostrato come, l'inibizione farmacologica a breve termine della via di segnale di eATP, tramite il blocco dei recettori P2X, migliori la funzione e la morfologia muscolare in un modello sperimentale di deficit di a-SG. L'effetto benefico esercitato dal blocco dei recettori purinergici è associato ad un'inibizione dell'infiammazione innata, una riduzione della risposta immunitaria adattativa e una diminuzione dei fattori di crescita fibrogenici.

Complessivamente i nostri dati indicano un ruolo pleiotropico della via di segnale eATP/P2XR nella patogenesi delle distrofie muscolari e puntano all'individuazione di antagonisti farmacologici dei recettori P2X come una possibile strategia terapeutica per migliorare la prognosi di questa condizione devastante.

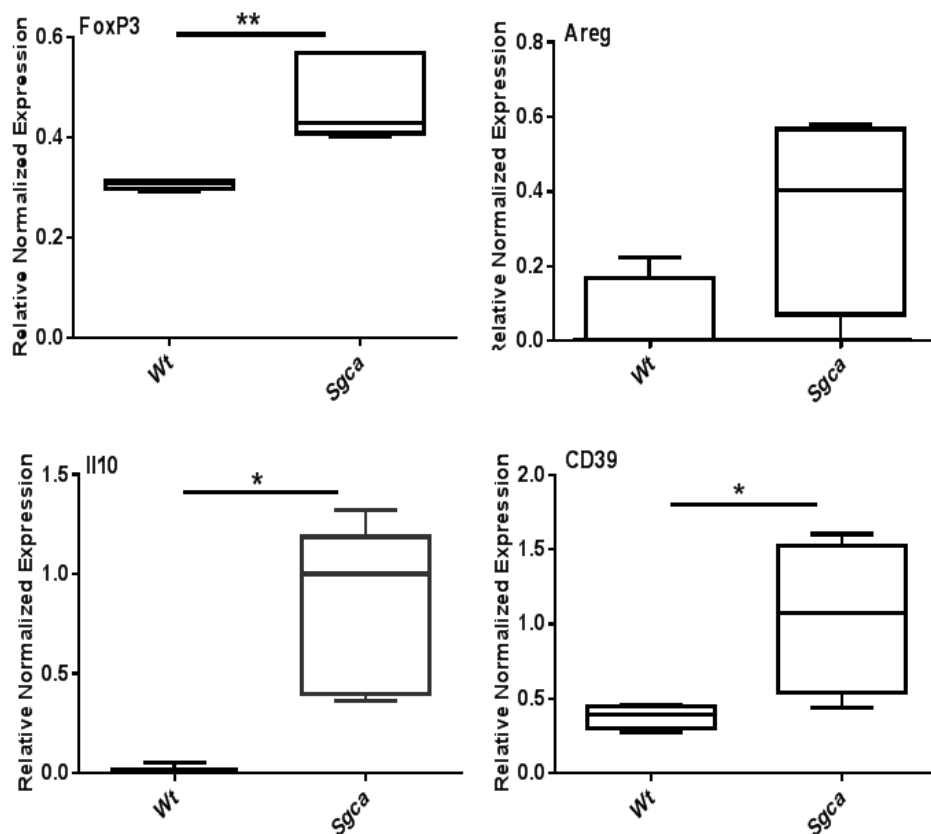


**Figura 10.**

I recettori purinergici P2X4 e P2X7 sono significativamente incrementati nel tessuto muscolare di topi Sgca.

L'RNA totale estratto da muscolo gastrocnemio isolato da 5 topi Sgca e 5 topi Wt è stato retrotrascritto. Il pattern di espressione dei recettori P2X (P2XR) è stato determinato mediante real time PCR. I livelli dei trascritti di P2X2R non erano misurabili. I livelli dei trascritti di P2X4R e P2X7R erano incrementati significativamente in topi Sgca. La GAPDH è stata utilizzata come gene di riferimento. I dati sono espressi come mediana, primo e terzo quartile (Q1-Q3). L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando il test U di Mann-Whitney (\* $p < 0,05$ ).

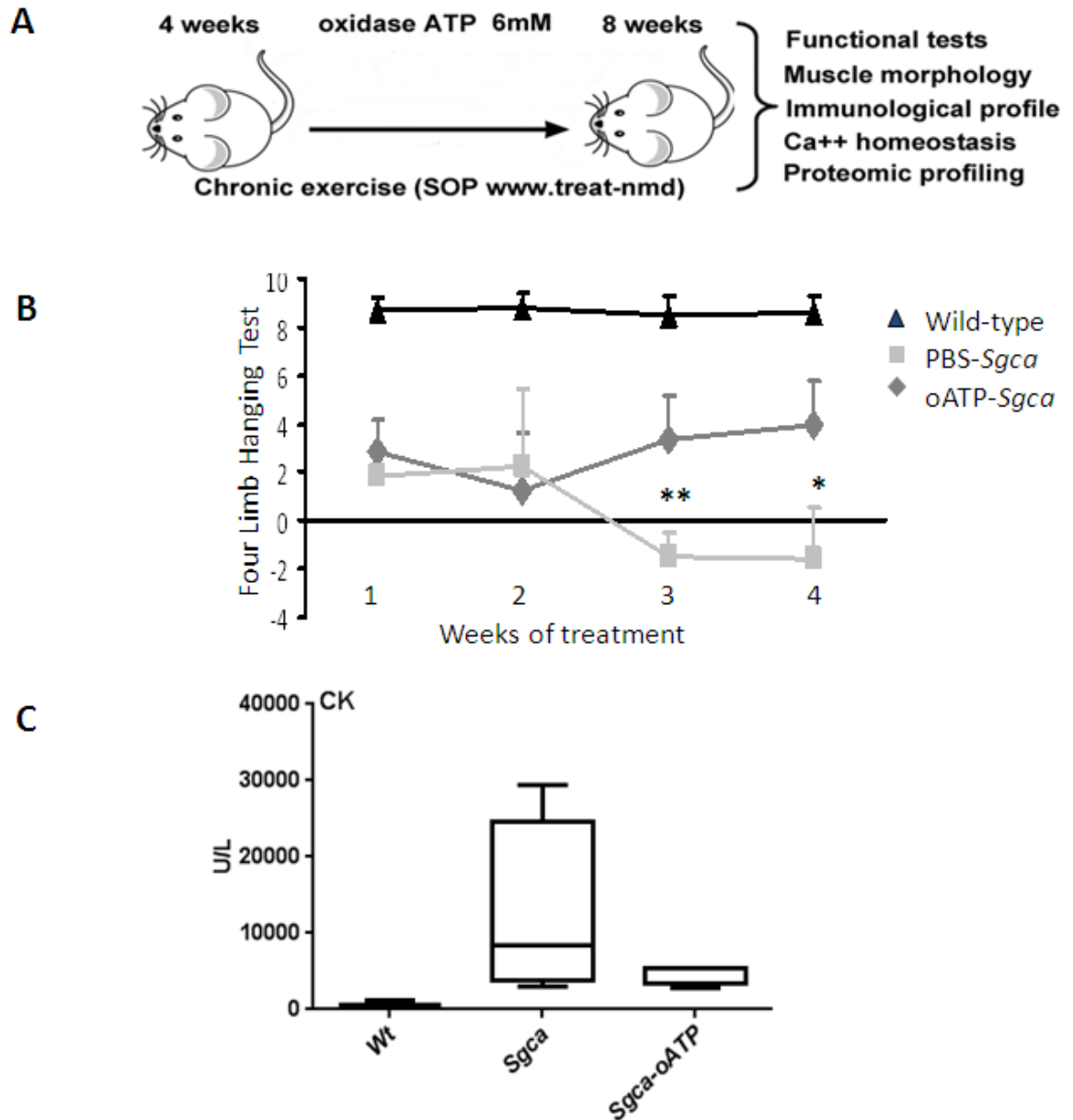




**Figura 11.**

Attivazione delle Treg in topi Sgca.

L'RNA totale estratto da muscolo gastrocnemio isolato da 5 topi Sgca e 5 topi Wt è stato retrotrascritto. I livelli dei trascritti di Foxp3, Areg, Il10 e CD39 sono stati quantificati mediante real-time PCR. La GAPDH è stata utilizzata come gene di riferimento. I dati sono espressi come mediana, primo e terzo quartile (Q1-Q3). L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando il test U di Mann-Whitney (\*\*p<0,01, \*=p<0,05).



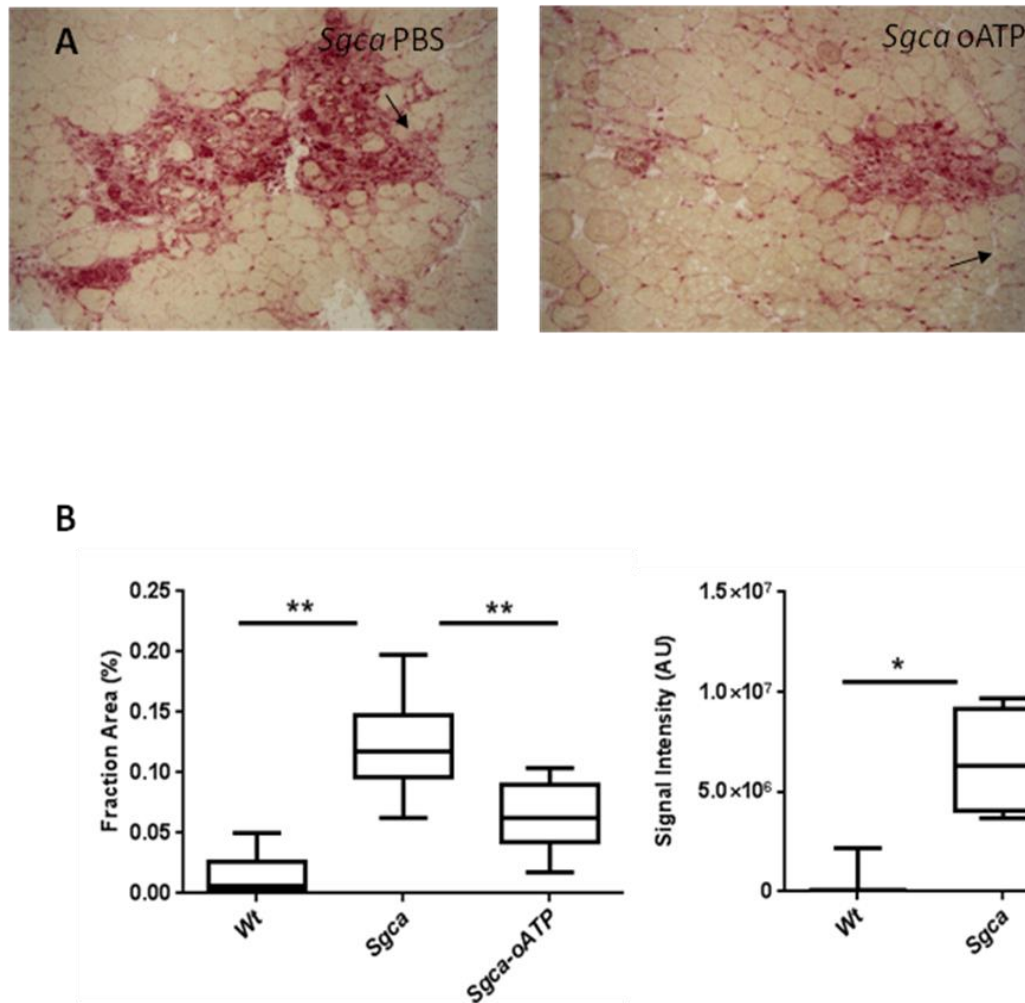
**Figura 12.**

oATP migliora la forza muscolare e migliora i livelli di CK sierico nei topi Sgca.

A: Topi Sgca, maschi, di 4 settimane e topi wild-type (Wt) sono stati trattati con 100  $\mu$ l di ATP ossidato (oATP) [6 mM] o soluzione salina (PBS), ogni giorno per 4 settimane con iniezione intraperitoneale.

B: Il test “Four limb hanging” è stato eseguito su topi Sgca non trattati (PBS-Sgca, quadrati grigio chiaro), topi trattati con oATP (oATP-Sgca, rombi grigio scuro), e controlli Wt di pari età (triangoli neri) al termine di ogni settimana di trattamento. Ogni valore rappresenta la media $\pm$ SEM di 5 animali. L’analisi statistica è stata eseguita utilizzando il test T di Student. \*\*= $p<0,01$  topi trattati con oATP rispetto a PBS, \*= $p<0,05$  topi trattati con oATP rispetto a PBS.

C: I livelli di CK sierico sono stati analizzati al termine delle 4 settimane di trattamento. I campioni di sangue sono stati ottenuti con puntura cardiaca da topi Sgca trattati con oATP (Sgca-oATP), da topi Sgca non trattati (Sgca) e topi wild-types (Wt) di pari età. Ogni box rappresenta la mediana, il primo e il terzo quartile di 5 animali. L’analisi statistica è stata eseguita utilizzando il test U di Mann-Whitney.



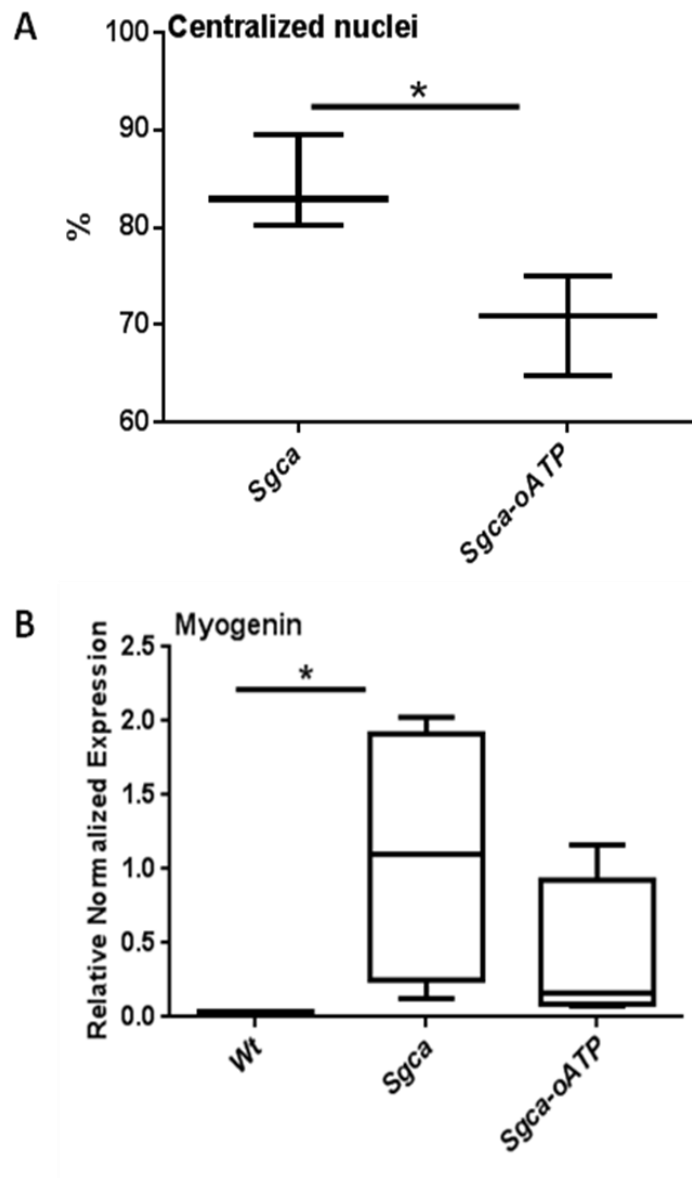
**Figura 13.**

oATP migliora l'estensione degli infiltrati infiammatori reattivi in topi Sgca.

A: Criosezioni di tessuto di muscolo gastrocnemio ottenuto da topi Sgca trattati con oATP per 4 settimane (Sgca oATP), e topi Sgca non trattati (Sgca PBS) sono state colorate con Fosfatasi Acida. Le frecce nere indicano gli infiltrati infiammatori. Sono mostrate immagini rappresentative. Ingrandimento finale, 10X.

B: Grafico della frazione % dell'area positiva e dell'intensità del segnale degli infiltrati infiammatori/mm<sup>2</sup> dell'area totale della sezione dei muscoli rappresentati in (A). I dati rappresentano le mediane, Q1-Q3 con n=5 animali per ogni gruppo sperimentale.

L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando test U di Mann-Whitney (\*\*p<0,01, \*=p<0,05).



**Figura 14.**

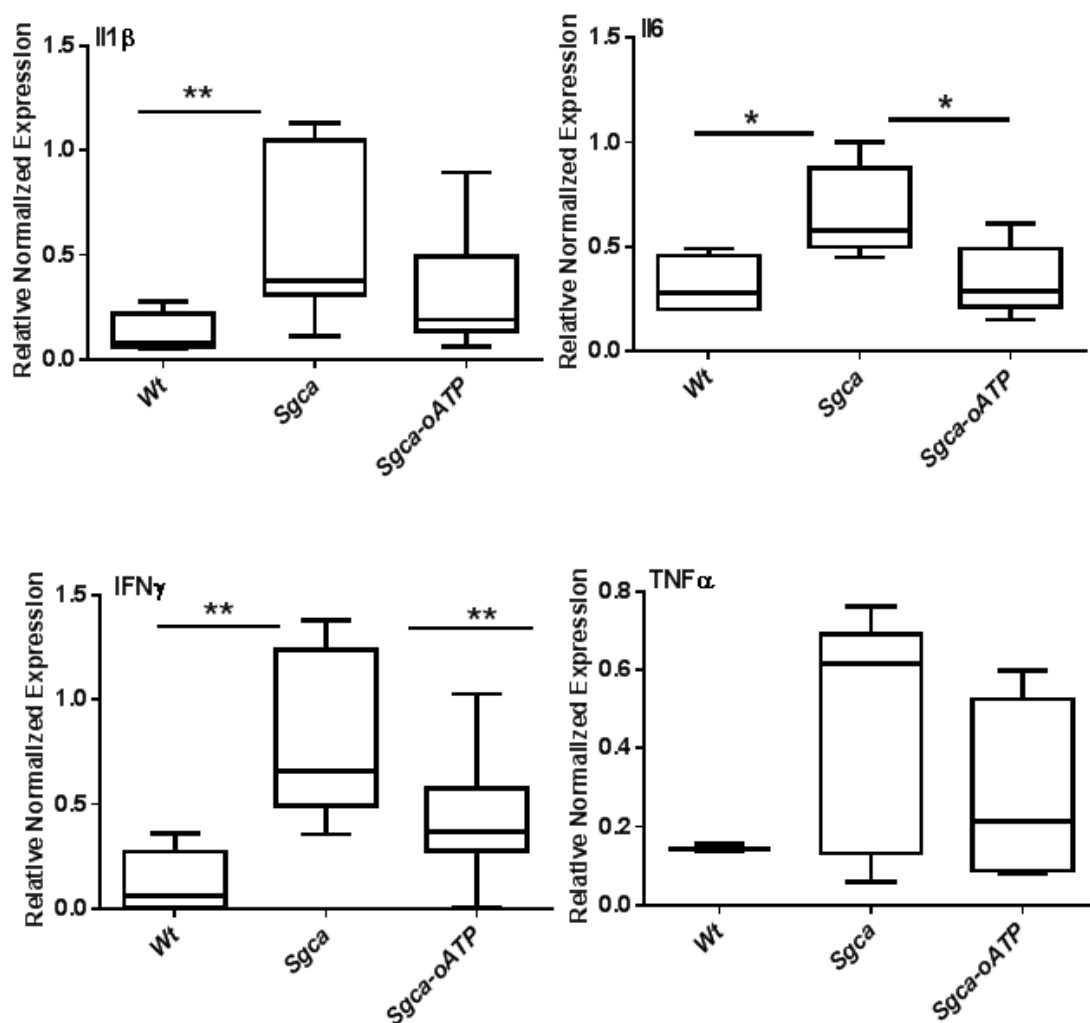
oATP migliora le caratteristiche morfologiche di topi Sgca.

A: Il numero di nuclei centralizzati è stato quantificato in 600 fibre di 3 sezioni consecutive di muscolo per ogni topo, rappresentato in Fig. 4A, (n=5 topi per gruppo sperimentale). I dati rappresentano le mediane, Q1-Q3, n=5 animali per ogni gruppo sperimentale.

L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando test U di Mann-Whitney (\*= $p < 0,05$ ).

B: L'RNA totale estratto da muscolo gastrocnemio isolato da topi Sgca trattati (Sgca-oATP), topi Sgca non trattati e topi Wt di pari età è stato retrotrascritto. I livelli dei trascritti di miogenina sono stati quantificati mediante real-time PCR. I dati rappresentano le mediane, Q1-Q3, n=5 animali per ogni gruppo sperimentale.

L'analisi statistica è stata eseguita mediante test U di Mann-Whitney (\*= $p < 0,05$ ).



**Figura 15.**

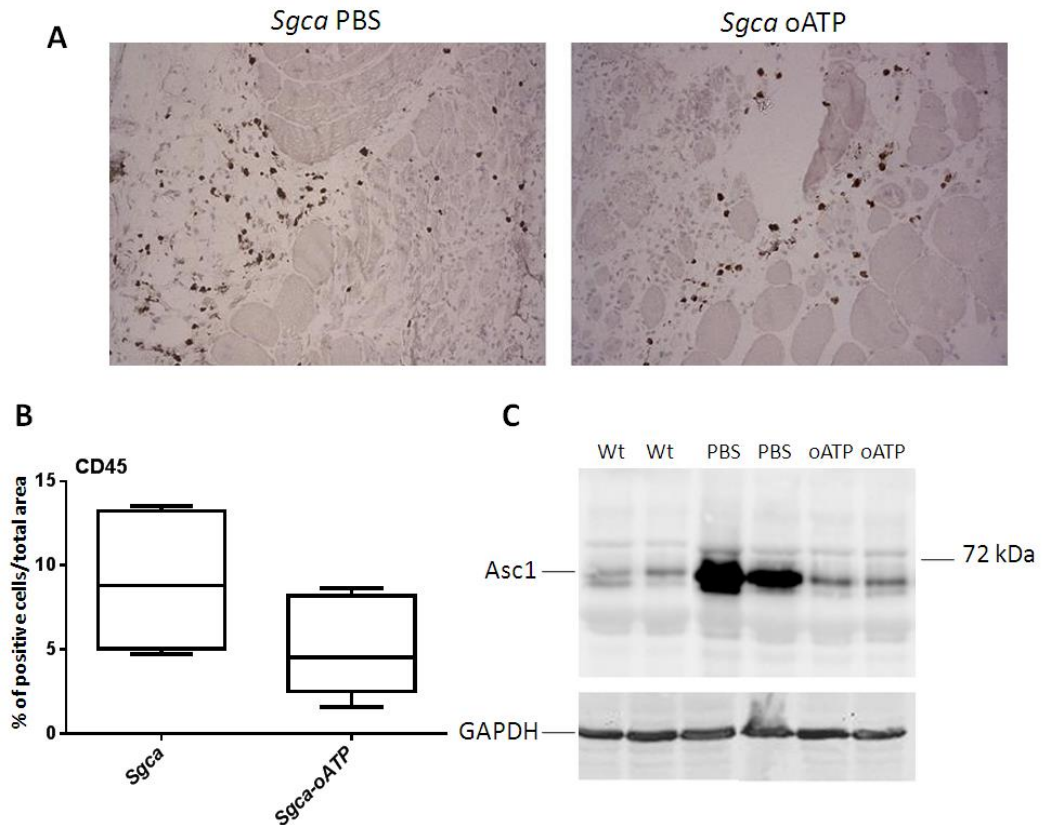
oATP induce una riduzione delle citochine infiammatorie nei muscoli di topi Sgca.

L'RNA totale estratto da muscolo gastrocnemio isolato da topi Sgca trattati con oATP (Sgca oATP), topi Sgca non trattati e controlli di pari età (Wt) è stato retrotrascritto.

I livelli dei trascritti dei geni Il1b, Il6, IFN $\gamma$  e TNF $\alpha$  sono stati quantificati mediante real-time PCR.

I dati rappresentano le mediane, Q1-Q3, n=5 animali per ogni gruppo sperimentale.

L'analisi statistica è stata eseguita mediante test U di Mann-Whitney (\*\*p<0,01, \*=p<0,05).



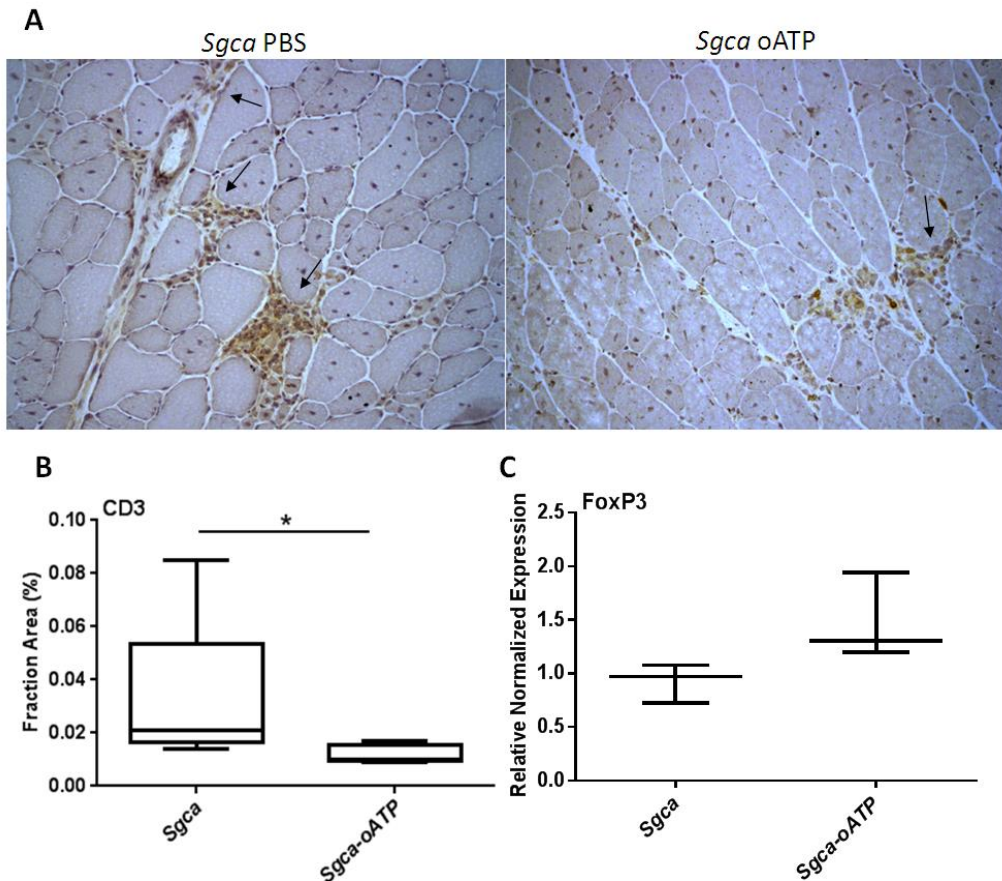
**Figura 16.**

oATP inibisce l'attivazione del'inflammasoma e degli infiltrati monocitari nei muscoli di topi Sgca.

A: Criosezioni di tessuto di muscolo gastrocnemio isolato da topi Sgca trattati con oATP per 4 settimane (Sgca oATP), e topi Sgca non trattati (Sgca PBS) sono state immunomarcate con un anticorpo anti-CD45 (BD Pharmigen). Sono mostrate immagini rappresentative. Ingrandimento finale, 20X.

B: Grafico della frazione % positiva per il segnale CD45/mm<sup>2</sup> dell'area totale della sezione dei muscoli rappresentati in (A). I dati rappresentano le mediane, Q1-Q3, n=5 animali per ogni gruppo sperimentale. L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando test U di Mann-Whitney.

C: I lisati totali di proteine sono stati isolati da muscolo gastrocnemio di topi Sgca trattati con oATP (ATP), topi Sgca non trattati (PBS) e controlli di pari età (Wt) e sono stati analizzati con Western Blot. Le membrane sono state marcate con un anticorpo monoclonale anti-Asc1 (Santa Cruz Biotechnology). I campioni sono stati analizzati in triplicato. Sono mostrate immagini rappresentative.



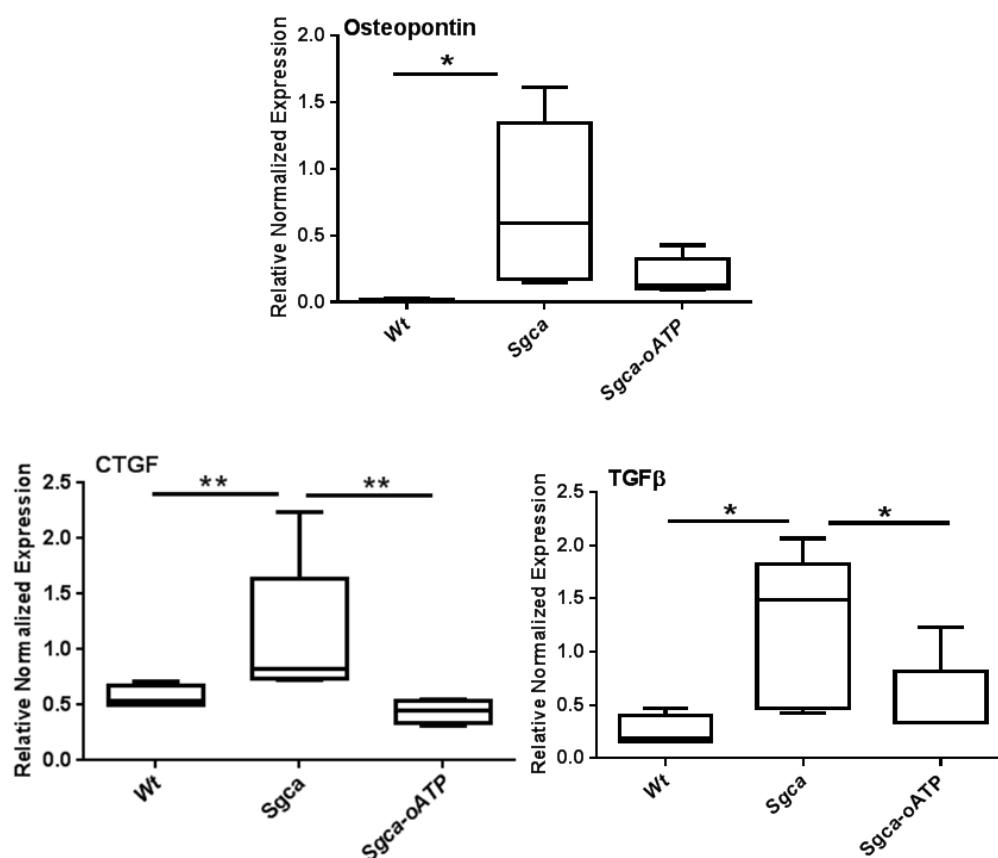
**Figura 17.**

oATP migliora l'estensione degli infiltrati positivi per CD3 nei topi *Sgca*.

A: Criosezioni di tessuto di muscolo gastrocnemio ottenuto da topi *Sgca* trattati per 4 settimane con oATP (*Sgca* oATP) e topi *Sgca* non trattati (*Sgca* PBS) sono state immunomarcate con un anticorpo anti-CD3 (Dako). Le frecce nere indicano gli infiltrati CD3 positivi. Sono mostrate immagini rappresentative. Ingrandimento finale, 20X.

B: Grafico della frazione percentuale dell'area positiva per il segnale CD3/mm<sup>2</sup> dell'area totale della sezione dei muscoli rappresentati in (A). I dati rappresentano le mediane, Q1-Q3, n=5 animali per ogni gruppo sperimentale. L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando test U di Mann-Whitney (\*= $p < 0,05$ ).

C: L'RNA totale estratto da muscolo gastrocnemio isolato da topi *Sgca* trattati con oATP (*Sgca* oATP) e topi *Sgca* non trattati è stato retrotrascritto. I livelli dei trascritti del gene FoxP3 sono stati quantificati mediante real-time PCR. I dati rappresentano le mediane, Q1-Q3, n=5 animali per ogni gruppo sperimentale. L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando test U di Mann-Whitney.



**Figura 18.**

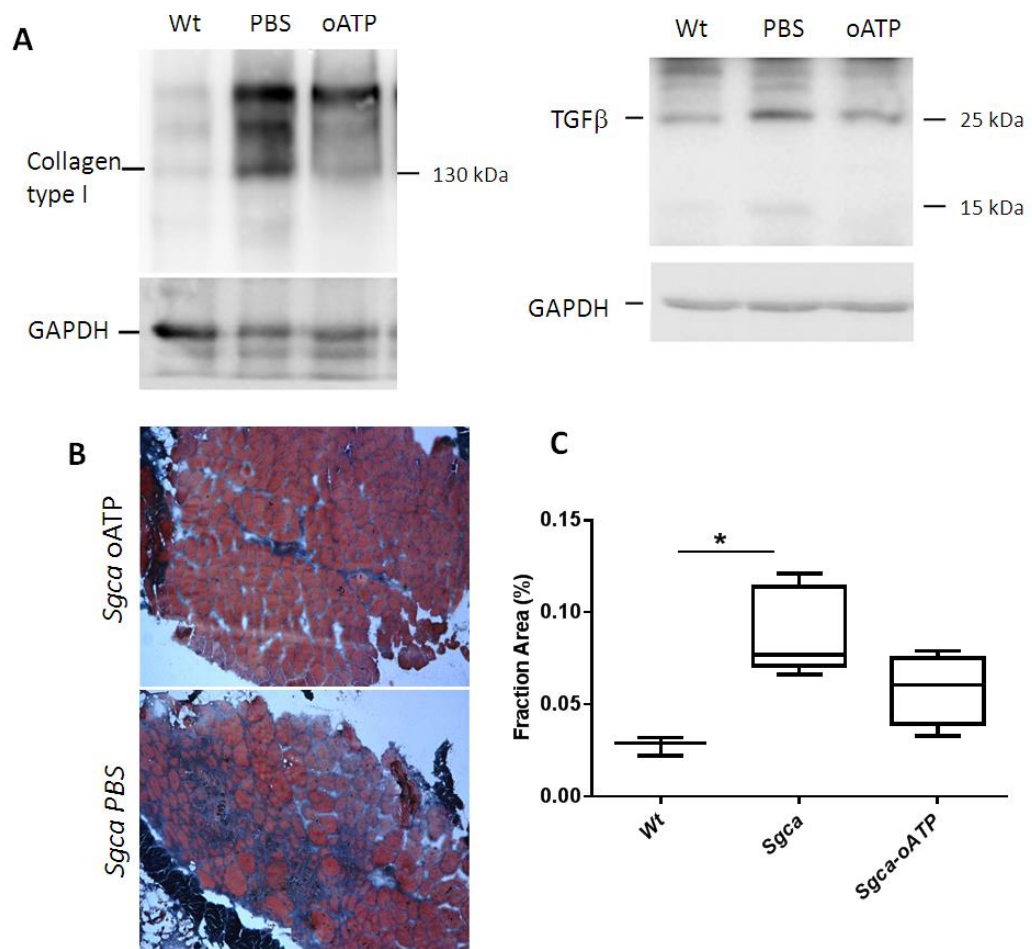
oATP induce la riduzione dei fattori profibrotici in muscoli di topi Sgca.

L'RNA totale estratto da muscolo gastrocnemio isolato da topi Sgca trattati con oATP (Sgca oATP), topi Sgca non trattati e controlli di pari età (Wt) è stato retrotrascritto.

I livelli dei trascritti dei geni Osteopontina, CTGF e TGFβ sono stati quantificati mediante real-time PCR. I dati rappresentano le mediane, Q1-Q3, n=5 animali per ogni gruppo sperimentale.

L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando test U di Mann-Whitney (\*= $p < 0,05$ ; \*\*= $p < 0,01$ ).





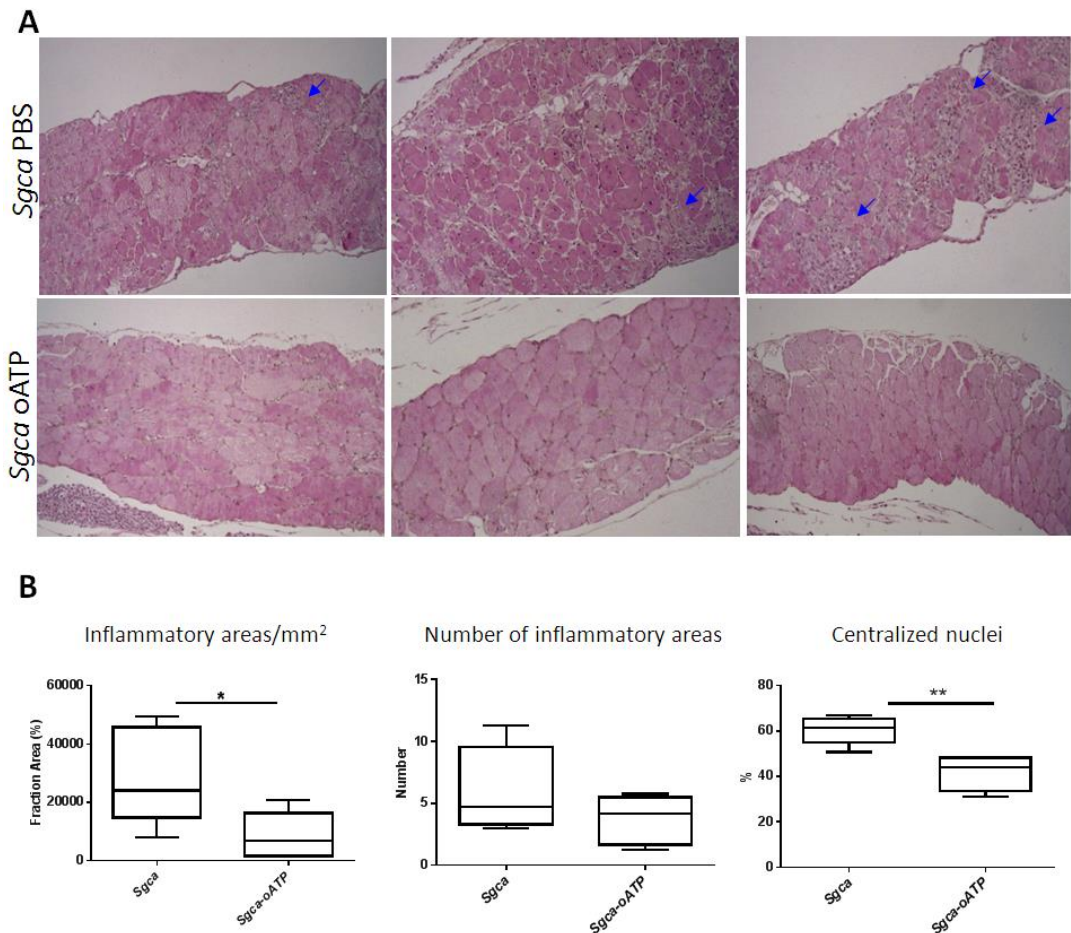
**Figura 19.**

oATP induce la riduzione dei fattori profibrotici per la deposizione di collagene in muscoli di topi Sgca.

A: Lisati totali di proteine sono stati isolati da muscolo gastrocnemio di topi Sgca trattati con oATP (ATP), topi Sgca non trattati (PBS) e controlli di pari età (Wt) e sono stati analizzati con Western Blot. Le membrane sono state marcate con un anticorpo policlonale anti-collagene di tipo I (Abcam) e un anticorpo monoclonale anti-TGFβ (dimero 25 kDa e monomero 15 kDa) (Abcam). Entrambe le proteine risultano ridotte negli animali trattati con oATP. Sono mostrate immagini rappresentative.

B: Criosezioni di tessuto di muscolo gastrocnemio ottenuto da topi Sgca trattati per 4 settimane con oATP (Sgca oATP) e topi Sgca non trattati (PBS) sono state colorate con tricromica di Masson. Sono mostrate immagini rappresentative. Ingrandimento finale, 10X.

C: Grafico della frazione percentuale dell'area positiva/mm<sup>2</sup> dell'area totale della sezione dei muscoli rappresentati in (B). I dati rappresentano le mediane, Q1-Q3, n=5 animali per ogni gruppo sperimentale. L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando test U di Mann-Whitney (\*=p<0,05).



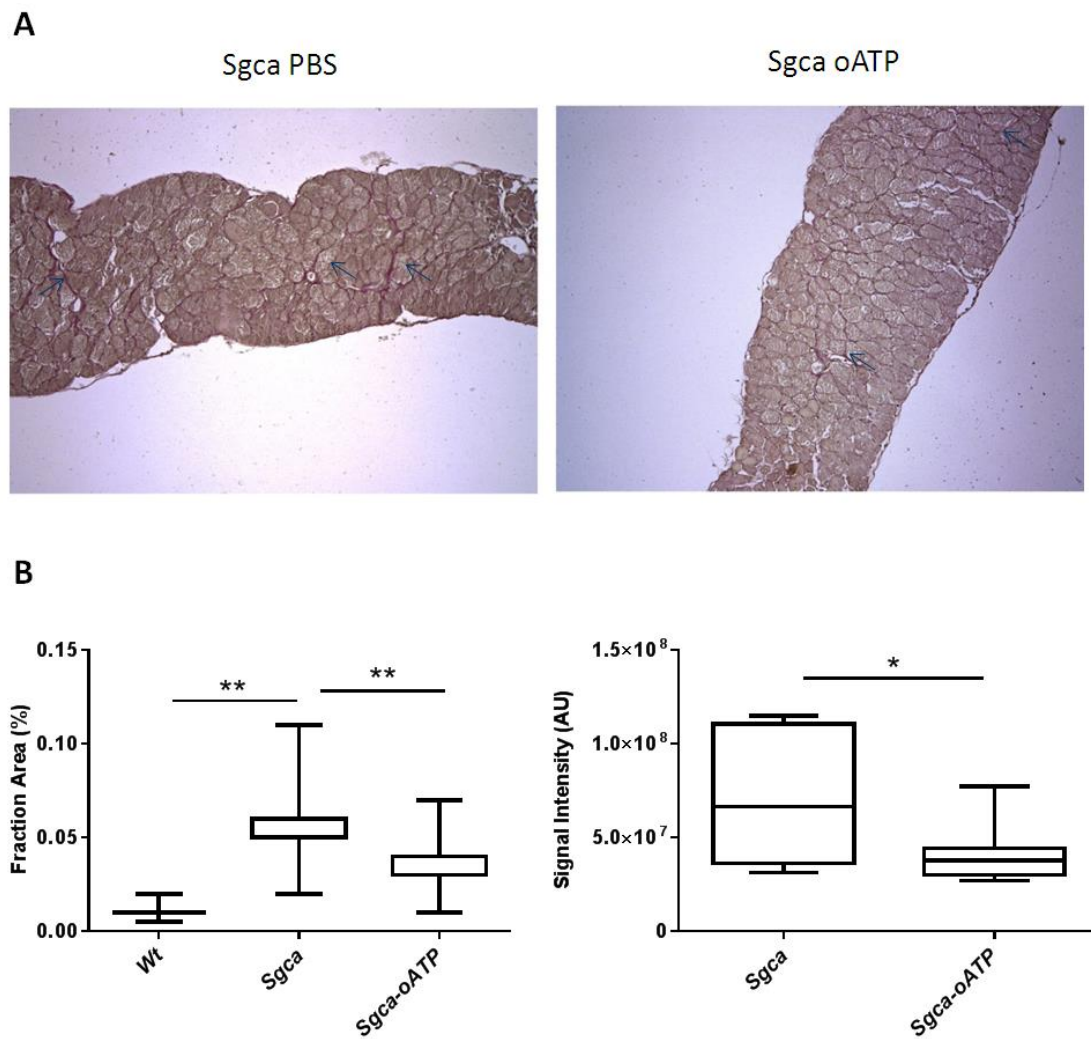
**Figura 20.**

oATP migliora la morfologia muscolare nei diagrammi di topi Sgca.

A: Sezioni di muscolo diaframma (incluso in paraffina) isolato da topi Sgca trattati per 4 settimane con oATP (Sgca oATP) e topi Sgca non trattati (Sgca PBS), colorate con tecnica standard Ematossilina & Eosina. Le frecce blu indicano gli infiltrati infiammatori. Sono mostrate immagini rappresentative. Ingrandimento finale, 10X.

B: Grafico della frazione percentuale delle aree positive e del numero degli infiltrati infiammatori/mm<sup>2</sup> dell'area totale della sezione dei muscoli rappresentati in (A).

Il numero dei nuclei centralizzati è stato quantificato in 600 fibre di 3 sezioni consecutive per ogni topo (n=5 per ogni gruppo sperimentale). I dati rappresentano le mediane, Q1-Q3, n=5 animali per ogni gruppo sperimentale. L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando test U di Mann-Whitney (\*=p<0,05; \*\*=p<0,01).



**Figura 21.**

oATP riduce l'estensione del tessuto fibrotico nei topi Sgca.

A: Sezioni di muscolo diaframma (incluso in paraffina) isolato da topi Sgca trattati per 4 settimane con oATP (Sgca oATP) e topi Sgca non trattati (Sgca PBS), colorate con tecnica Picrosirius red. Le frecce blu indicano il tessuto fibrotico endomisiale. Sono mostrate immagini rappresentative. Ingrandimento finale, 10X.

B: Grafico della frazione percentuale delle aree fibrotiche e dell'intensità del segnale/mm<sup>2</sup> dell'area totale della sezione dei muscoli rappresentati in (A).

I dati rappresentano le mediane, Q1-Q3, n=5 per ogni gruppo sperimentale. L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando test U di Mann-Whitney (\*=p<0,05; \*\*=p<0,01).

## 5. DISCUSSIONE

Cresce l'apprezzamento che, nelle distrofie muscolari, l'instabilità di membrana causata dal deficit della glicoproteina determina alterazioni complesse e la conseguente morte delle cellule necrotiche risultato nel rilascio di DAMP intracellulari. Questi DAMP a loro volta reclutano cellule infiammatorie con conseguente ossidazione di detriti extracellulari, interiorizzazione e presentazione di antigeni da parte di cellule presentatrici di antigeni e, infine attivazione del sistema immunitario adattivo.

Nel muscolo, l'abbondanza di ATP all'interno delle cellule e la sua assenza virtuale nello spazio interstiziale lo rende un bersaglio ideale di danno ai tessuti.

Con questi lavori, sono state fornite prove sperimentali che l'inibizione del signalinge ATP/P2X, tramite l'antagonista dei recettori purinergici oxidase-ATP (oATP), riduce la progressione del fenotipo distrofico migliorando la funzione e la morfologia muscolare, incrementa il potenziale rigenerativo delle cellule satelliti e inibisce l'infiltrazione di leucociti e macrofagi con un decremento dell'espressione di interleuchina (IL)-1 $\beta$  e IL-6 in modelli murini di due differenti distrofie muscolari.

Inoltre, le cellule muscolari esprimono componenti chiave dell'attivazione dell'inflammasoma, suggerendo che esse stesse possano esercitare un ruolo diretto nello sviluppo e nel mantenimento della risposta infiammatoria.

Questi risultati complessivamente indicano un potenziale ruolo patogenetico esercitato da eATP in topi mdx e Sgca, come dimostrato dal miglioramento della forza e della morfologia muscolare mediante la somministrazione sistematica di oATP, associato a una sostanziale riduzione dell'infiltrato infiammatorio e una diminuzione di IL-6 a livello muscolare.

Di rilievo, in topi mdx e topi Sgca, l'oATP modula la composizione del pool di cellule T infiltranti nei muscoli distrofici, stimolando la presenza di Tregs Foxp3+ ad azione pro-rigenerativa. Tale effetto è di estremo interesse in considerazione dei clinical trial attualmente in corso e focalizzati sulla sicurezza e efficacia di terapie cellulari con Tregs in patologie autoimmunitarie e infiammatorie ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)).

L'obiettivo finale del progetto è quello di poter sviluppare in futuro una strategia terapeutica innovativa, mediante regolazione selettiva dei componenti della pathway eATP/recettori purinergici, nelle distrofie muscolari dell'età infantile, focalizzata all'aspetto infiammatorio, che potrebbe in futuro essere utilizzata in associazione con la terapia genica e/o cellulare ("combination-therapy").

## 6. BIBLIOGRAFIA

1. Moser H. 1984. Duchenne muscular dystrophy: pathogenetic. aspects and genetic prevention. *Human Genetics*; 66: 17–40.
2. Hoffman EP, Brown RH Jr., Kunkel LM. 1987. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell*; 51: 919–928.
3. Campbell KP. 1995. Three muscular dystrophies: loss of cytoskeleton-extracellular matrix linkage. *Cell*; 80: 675–679.
4. Cohn RD, Campbell KP. Molecular basis of muscular dystrophies. *Muscle Nerve* 2000; 23: 1456–1471.
5. Politano L, Nigro V, Passamano L, Petretta VR, Comi LI, Papparella S, Rambaldi PF, Raia P, Pini A, Mora M, Giugliano MAM, Esposito MG, Nigro G, Nigro Ge. 2001. Evaluation of cardiac and respiratory involvement in sarcoglycanopathies. *Neuromuscul Disord*; 11: 178–185.
6. Hack AA, Lam MY, Cordier L, Shoturma DI, Ly CT, Hadhazy MA, Hadhazy MR, Sweeney HL, McNally EM. 2000. Differential requirement for individual sarcoglycans and dystrophin in the assembly and function of the dystrophin-glycoprotein complex. *J Cell Sci*; 113: 2535–2544.
7. Vorgerd M, Gencik M, Mortier J, Epplen JT, Malin JP, Mortier W. 2001. Isolated loss of gamma-sarcoglycan: diagnostic implications in autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies. *Muscle Nerve*; 24: 421–424.
8. Bonnemann CG, Wong J, Jones KJ, Lidov HG, Feener CA, Shapiro F, Darras BT, Kunkel LM, North KN. 2002. Primary gamma-sarcoglycanopathy (LGMD 2C): broadening of the mutational spectrum guided by the immunohistochemical profile. *Neuromuscul Disord*; 12: 273–280.
9. Daniele N, Richard I, Bartoli M. 2006. Ins and outs of therapy in limb girdle muscular dystrophies. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*; 39: 1608-1624.
10. Lim LE, Rando TA. 2008. Technology insight: therapy for Duchenne muscular dystrophy-an opportunity for personalized medicine? *Nature Clinical Practice Neurology*; 4: 149-158.

11. van Ommen GJ, van Deutekom J, Aartsma-Rus A. 2008. The therapeutic potential of antisense-mediated exon skipping. *Current Opinion in Molecular Therapeutics*; 10: 140-149.
12. Cossu G, Sampaolesi M. 2007. New therapies for Duchenne muscular dystrophy: challenges, prospects and clinical trials. *Trends in Molecular Medicine*; 13: 520-526.
13. Price FD et al. 2007. Stem cell based therapies to treat muscular dystrophy. *Biochimica et Biophysica Acta*; 1772: 272-283.
14. Lapidos KA et al. 2004. Transplanted hematopoietic stem cells demonstrate impaired sarcoglycan expression after engraftment into cardiac and skeletal muscle. *Journal of Clinical Investigation*; 114: 1577-1585.
15. Wallace GQ et al. 2008. Long-term survival of transplanted stem cells in immunocompetent mice with muscular dystrophy. *American Journal of Pathology*; 173: 792-802.
16. Sampaolesi M et al. 2003. Cell therapy of  $\alpha$ -sarcoglycan null dystrophic mice through intra-arterial delivery of mesoangioblasts. *Science*; 301: 487-492.
17. Sampaolesi M et al. 2006. Mesoangioblast stem cells ameliorate muscle function in dystrophic dogs. *Nature*; 444: 574-579.
18. Hermann T. 2007. Aminoglycoside antibiotics: old drugs and new therapeutic approaches. *Cellular and Molecular Life Sciences*; 64: 1841-1852.
19. Du M et al. 2008. PTC124 is an orally bioavailable compound that promotes suppression of the human CFTR-G542X nonsense allele in a CF mouse model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 105: 2064-2069.
20. Welch EM et al. 2007. PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. *Nature*; 447: 87-91.
21. Berchtold MW, Brinkmeier H, Muntener M. 2000. Calcium ion in skeletal muscle: Its crucial role for muscle function, plasticity, and disease. *Physiological Reviews*; 80: 1215–1265.
22. De Paepe B, De Bleecker JL. 2013. Cytokines and chemokines as regulators of skeletal muscle inflammation: presenting the case of Duchenne muscular dystrophy. *Mediators of Inflammation*; 2013: Article ID540370.
23. Saito K, Kobayashi D, Komatsu M, et al. 2000. A sensitive assay of tumor necrosis factor  $\alpha$  in sera from Duchenne muscular dystrophy patients. *Clinical Chemistry*; 46: 1703–1704.

24. Evans NP, Misyak SA, Robertson JL, Bassaganya-Riera J, Grange RW. 2009. Immune-mediated mechanisms potentially regulate the disease time-course of Duchenne muscular dystrophy and provide targets for therapeutic intervention. *PM R*;1: 755–768.
25. De Pasquale L, D'Amico A, Verardo M, Petrini S, Bertini E, De Benedetti F. 2012. Increased muscle expression of interleukin-17 in Duchenne muscular dystrophy. *Neurology*; 78: 1309–1314.
26. Rufo A, Del Fattore A, Capulli M, et al. 2011. Mechanisms inducing low bone density in Duchenne muscular dystrophy in mice and humans. *Journal of Bone and Mineral Research*; 26: 1891–1903.
27. Rubartelli A, Lotze MT. 2007. Inside, outside, upside down: damage-associated molecular-pattern molecules (DAMPs) and redox. *Trends Immunol*; 28: 429–436.
28. Willart MA, Lambrecht BN. 2009. The danger within: endogenous danger signals, atopy and asthma. *Clin Exp Allergy*; 39: 12–19.
29. Bours MJ, Swennen EL, Di Virgilio F, Cronstein BN, Dagnelie PC. 2006. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *PharmacolTher*; 112: 358–404.
30. Pizzirani C, Ferrari D, Chiozzi P, Adinolfi E, Sandonà D, Savaglio E, Di Virgilio F. 2007. Stimulation of P2 receptors causes release of IL-1 $\beta$ -loaded microvesicles from human dendritic cells. *Blood*; 109: 3856–3864.
31. Schenk U, Westendorf AM, Radaelli E, Casati A, Ferro M, Fumagalli M, Verderio C, Buer J, Scanziani E, Grassi F. 2008. Purinergic control of T cell activation by ATP released through pannexin-1 hemichannels. *Sci Signal*; 1: ra6.
32. Schenk U, Frascoli M, Proietti M, Geffers R, Traggiai E, Buer J, Ricordi C, Westendorf AM, Grassi F. 2011. ATP inhibits the generation and function of regulatory T cells through the activation of purinergic P2X receptors. *Sci Signal*; 4: ra12.
33. Ardisson V, Radaelli E, Zaratini P, Ardizzone M, Ladel C, Gattorno M, Martini A, Grassi F, Traggiai E. 2011. Pharmacologic P2X purinergic receptor antagonism in the treatment of collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*; 63: 3323–3332.
34. Vergani A, Fotino C, D'Addio F, Tezza S, Podetta M, Gatti F, Chin M, Bassi R, Molano RD, Corradi D, Gatti R, Ferrero ME, Secchi A, Grassi F, Ricordi C, Sayegh MH, Maffi P, Pileggi A, Fiorina P. 2013. Effect of the purinergic inhibitor oxidized ATP in a model of islet allograft rejection. *Diabetes*; 62: 1665–1675.

35. Vergani A, Tezza S, D'Addio F, Fotino C, Liu K, et al. 2013. Long-term heart transplant survival by targeting the ionotropic purinergic receptor P2X7. *Circulation*; 127: 463-475.
36. Samstein RM, Arvey A, Josefowicz SZ, Peng X, Reynolds A, et al. 2012. Foxp3 exploits a pre-existent enhancer landscape for regulatory T cell lineage specification. *Cell*; 151: 153-166.
37. Josefowicz SZ, Lu LF, Rudensky AY. 2012. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu Rev Immunol*; 30: 531-564.
38. Alho AC, Kim HT, Chammas MJ, Reynolds CG, Matos TR, et al. 2016. Unbalanced recovery of regulatory and effector T cells after allogeneic stem cell transplantation contributes to chronic GVHD. *Blood*; 127: 646-657.
39. Brunstein CG, Miller JS, McKenna DH, Hippen KL, DeFor TE, et al. 2016. Umbilical cord blood-derived T regulatory cells to prevent GVHD: kinetics, toxicity profile and clinical effect. *Blood*; 127:1044-1051.
40. von Spee-Mayer C, Siegert E, Abdirama D, Rose A, Klaus A, et al. 2016. Low-dose interleukin-2 selectively corrects regulatory T cell defects in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*; 75: 1407-1415.
41. Truman LA, Pekalski ML, Kareclas P, Evangelou M, Walker NM, Howlett J, Mander AP, Kennet J, Wicker LS, Bond S, Todd JA, Waldron-Lynch F. 2015. Protocol of the adaptive study of IL-2 dose frequency on regulatory T cells in type 1 diabetes (DILfrequency): a mechanistic, non-randomised, repeat dose, open-label, response-adaptive study. *BMJ Open*;5:e009799.
42. Villalta SA, Rosenthal W, Martinez L, Kaur A, Sparwasser T, Tidball JG, Margeta M, Spencer MJ, Bluestone JA. 2014. Regulatory T cells suppress muscle inflammation and injury in muscular dystrophy. *Sci Transl Med*; 6: 258ra142.
43. Villalta SA, Rinaldi C, Deng B, Liu G, Fedor B, Tidball JG. 2011. Interleukin-10 reduces the pathology of mdx muscular dystrophy by deactivating M1 macrophages and modulating macrophage phenotype. *Hum Mol Genet*; 20: 790-805.
44. Burzyn D, Kuswanto W, Kolodin D, Shadrach JL, Cerletti M, Jang Y, Sefik E, Tan TG, Wagers AJ, Benoist C, Mathis D. 2013. A special population of regulatory T cells potentiates muscle repair. *Cell*; 155: 1282-1295.
45. Rawat R, Cohen TV, Ampong B, Francia D, Henriques-Pons A, Hoffman EP, Nagaraju K. 2010. Inflammasome up-regulation and activation in dysferlin-deficient skeletal muscle. *Am J Pathol*; 176: 2891-2900.



46. Yeung D, Kharidia R, Brown SC, Górecki DC. 2004. Enhanced expression of the P2X<sub>4</sub> receptor in Duchenne muscular dystrophy correlates with macrophage invasion. *Neurobiol Dis*; 15: 212-220.
47. Jiang T, Yeung D, Lien CF, Górecki DC. 2005. Localized expression of specific P2X receptors in dystrophin-deficient DMD and mdx muscle. *Neuromuscul Disord*; 15:225–236.
48. Yeung D, Zablocki K, Lien CF, Jiang T, Arkle S, Brutkowski W, Brown J, Lochmuller H, Simon J, Barnard EA, Gorecki DC. 2006. Increased susceptibility to ATP via alteration of P2X receptor function in dystrophic mdx mouse muscle cells. *FASEB J*; 20: 610–620.
49. Betto R, Senter L, Ceoldo S, et al. 1999. Ecto-ATPase activity of alpha-sarcoglycan (adhalin). *J BiolChem*; 274: 7907-7912.
50. Sandonà D, Gastaldello S, Martinello T, Betto R. 2004. Characterization of the ATP-hydrolysing activity of alpha-sarcoglycan. *Biochem J*; 381: 105-112.
51. Maaikje van Putten et al. SOP (ID) number: DMD\_M.2.1.004. Last reviewed June 29th, 2016.
52. Nelson DW, Gregg RJ, Kort ME, Perez-Medrano A, Voight EA, Wang Y, et al. 2006. Structure-activity relationship studies on a series of novel, substituted 1-benzyl-5-phenyltetrazole P2X<sub>7</sub> antagonists. *J Med Chem*; 49: 3659-3666.
53. McGaraughty S, Chu KL, Namovic MT, Donnelly-Roberts DL, Harris RR, Zhang XF, et al. 2007. P2X<sub>7</sub>-related modulation of pathological nociception in rats. *Neuroscience*; 146: 1817-1828.
54. Teixeira JM, Oliveira MC, Parada CA, Tambeli CH. 2010. Peripheral mechanisms underlying the essential role of P2X<sub>7</sub> receptors in the development of inflammatory hyperalgesia. *Eur J Pharmacol*; 644: 55-60.
55. Jimenez-Pacheco A, Mesuret G, Sanz-Rodriguez A, Tanaka K, Mooney C, Conroy R, et al. 2013. Increased neocortical expression of the P2X<sub>7</sub> receptor after status epilepticus and anticonvulsant effect of P2X<sub>7</sub> receptor antagonist A-438079. *Epilepsia*; 54: 1551-1561.
56. Mesuret G, Engel T, Hessel EV, Sanz-Rodriguez A, Jimenez-Pacheco A, Miras-Portugal MT, et al. 2014. P2X<sub>7</sub> receptor inhibition interrupts the progression of seizures in immature rats and reduces hippocampal damage. *CNS Neurosci Ther*; 20: 56-64.
57. Marcellino D, Suárez-Boomgaard D, Sánchez-Reina MD, Aguirre JA, Yoshitake T, Yoshitake S, et al. 2010. On the role of P2X(7) receptors in dopamine nerve cell

degeneration in a rat model of Parkinson' disease: studies with the P2X(7) receptor antagonist A-438079. *J Neural Transm*; 117: 681-687.

58. Sociali G, Visigalli D, Prukop T, Cervellini I, Mannino E, Venturi C, Bruzzone S, Sereda MW, Schenone A. 2016. Tolerability and efficacy study of P2X7 inhibition in experimental Charcot-Marie-Tooth type 1A (CMT1A) neuropathy. *Neurobiol Dis*; 95: 145-157.

59. Ermolova NV, Martinez L, Vetrone SA, Jordan MC, Roos KP, Sweeney HL, Spencer MJ. 2014. Long term administration of the TNF blocking drug Remicade (cV1q) to mdx mice reduces skeletal and cardiac muscle fibrosis, but negatively impacts cardiac function. *Neuromuscul Disord*; 24: 583-595.

60. Uaesoontrachoon K, Quinn JL, Tatem KS, Van Der Meulen JH, Yu Q, et al. 2014. Long-term treatment with naproxen significantly improves skeletal and cardiac disease phenotype in the mdx mouse model of dystrophy. *Hum Mol Genet*; 23: 3239-3249.

61. Grounds MD, Radley HG, Lynch GS, Nagaraju K, De Luca A. 2008. Towards developing standard operating procedures for pre-clinical testing in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Neurobiol Dis*; 31:1e19.

62. Minetti GC, Colussi C, Adami R, Serra C, Mozzetta C, Parente V, Fortuni S, Straino S, Sampaolesi M, Di Padova M, Illi B, Gallinari P, Steinkühler C, Capogrossi MC, Sartorelli V, Bottinelli R, Gaetano C, Puri PL. 2006. Functional and morphological recovery of dystrophic muscles in mice treated with deacetylase inhibitors. *Nat Med*; 12: 1147e1150.

63. Hossain MA, Man BC, Zhao C, Xu Q, Du XJ, Wade JD, Samuel CS. 2011. H3 relaxin demonstrates antifibrotic properties via the RXFP1 receptor. *Biochemistry*; 50: 1368-1375.

64. Gazzerò E, Assereto S, Bonetto A, Sotgia F, Scarfi S, Pistorio A., Bonuccelli G, Cilli M, Bruno C, Zara F, Lisanti MP, Minetti C. 2010. Therapeutic potential of proteasome inhibition in Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Am J Pathol*; 176: 1863-1877.

65. Labasi JM, Petrushova N, Donovan C, McCurdy S, Lira P, Payette MM, Brissette W, Wicks JR, Audoly L, Gabel CA. 2002. Absence of the P2X7 receptor alters leukocyte function and attenuates an inflammatory response. *J Immunol*; 168: 6436–6445.

66. Sharp AJ, Polak PE, Simonini V, Lin SX, Richardson JC, Bongarzone ER, Feinstein DL. 2008. P2x7 deficiency suppresses development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroinflammation*; 5: 33.
67. Taylor SR, Turner CM, Elliott JJ, McDaid J, Hewitt R, Smith J, Pickering MC, Whitehouse DL, Cook HT, Burnstock G, Pusey CD, Unwin RJ, Tam FW. 2009. P2X7 deficiency attenuates renal injury in experimental glomerulonephritis. *J Am SocNephrol*; 20: 1275–1281.
68. Moyle LA, Zammit PS. 2014. Isolation, culture and immunostaining of skeletal muscle fibres to study myogenic progression in satellite cells. *Methods MolBiol*; 1210: 63-78.
69. Morosetti R, Broccolini A, Sancricca C, Gliubizzi C, Gidaro T, Tonali PA, Ricci E, Mirabella M. 2010. Increased aging in primary muscle cultures of sporadic inclusion-body myositis. *NeurobiolAging*; 31:1205-1214.
70. Lohman AW, Isakson BE. 2014. Differentiating connexin hemichannels and pannexin channels in cellular ATP release. *FEBS Lett*; 588: 1379-1388.
71. Lazarowski ER. 2012. Vesicular and conductive mechanisms of nucleotide release. *Purinergic Signal*; 8: 359-373.
72. Fruscione F, Scarfi S, Ferraris C, Bruzzone S, Benvenuto F, Guida L, Uccelli A, Salis A, Usai C, Jacchetti E, Ilengo C, Scaglione S, Quarto R, Zocchi E, De Flora A. 2011. Regulation of human mesenchymal stem cell functions by an autocrine loop involving NAD<sup>+</sup> release and P2Y<sub>11</sub>-mediated signaling. *Stem Cells Dev*; 20: 1183-1198.
73. Sperlagh B, Kittel A, Lajtha A, Vizi ES. 1995. ATP acts as fast neurotransmitter in rat habenula: neurochemical and enzyme cytochemical evidence. *Neuroscience*; 66: 915-920.
74. Bruzzone S, Basile G, Chothi MP, Nobbio L, Usai C, Jacchetti E, Schenone A, Guse AH, Di Virgilio F, De Flora A, Zocchi E. 2010. Diadenosine homodinucleotide products of ADP-ribosylcyclases behave as modulators of the purinergic receptor P2X<sub>7</sub>. *J Biol Chem*; 285: 21165-21174.
75. Lu D, Insel PA. 2013. Hydrolysis of extracellular ATP by ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase (ENTPD) establishes the set point for fibrotic activity of cardiac fibroblasts. *J Biol Chem*; 288: 19040-19049.

76. Köhler D, Eckle T, Faigle M, et al. 2007. CD39/ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 provides myocardial protection during cardiac ischemia/reperfusion injury. *Circulation*; 116: 1784–1794.
77. Grenz A, Zhang H, Hermes M, Eckle T, Klingel K, Huang DY, Müller C E, Robson SC, Osswald H, Eltzschig HK. 2007. Contribution of E-NTPDase1 (CD39) to renal protection from ischemia perfusion injury. *FASEB J*; 21: 2863–2873.
78. Murgia M, Hanau S, Pizzo P, Rippa M, Di Virgilio F. 1993. Oxidized ATP. An irreversible inhibitor of the macrophage purinergic P2Z receptor. *J BiolChem*; 268: 8199–8203.
79. Di Virgilio F. 2003. Novel data point to a broader mechanism of action of oxidized ATP: the P2X7 receptor is not the only target. *Br J Pharmacol*; 140: 441-443.